

TEKNILLINEN KORKEAKOULU

Elektroniikan, tietoliikenteen ja automaation tiedekunta

Tiina Saloniemi

Diabeettinen neuropatia ja TRPA1-kanavien esiintyminen: koelaitteiston pystytys sekä sähköfysiologisten kokeiden toteuttaminen rottien selkäydinleikkeistä

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-insinöörin tutkintoa varten Espoossa 24.11.2008

Työn valvoja: Professori Mikko Sams

Työn ohjaaja: FT Ari-Pekka Koivisto

**Tekijä:** Tiina Saloniemi

**Työn nimi:** Diabeettinen neuropatia ja TRPA1-kanavien esiintyminen: koelaitteiston pystytys sekä sähköfysiologisten kokeiden toteuttaminen rottien selkäydinleikkeistä

**Päivämäärä:** 5.11.2008

**Sivumäärä:** 8 + 109

**Osasto:** Lääketieteellisen tekniikan ja laskennallisen tieteen laitos

**Professuuri:** Kognitiivinen teknologia

**Koodi:** S-114

**Työn valvoja:** professori Mikko Sams

**Työn ohjaaja:** FT Ari-Pekka Koivisto

**Tiivistelmäteksti:**

Diabeettista neuropatiaa havaitaan noin 50% tyypin I tai II diabetesta sairastavilla potilailla. Neuropatia aiheuttaa hermoston herkistymistä ärsykeille, allodyniaa, dysestesiaa, hyperalgesiaa, hyperpatiaa ja tukekipua. Diplomityössä keskitytään diabeettisen neuropatian vaikutuksiin selkäytimen substantia gelatinosan ja takajuuren kautta selkäyttimeen tulevien primäärien afferenttien kipuhermojen synapsialueen aktiviteetissa. Hypoteesina on diabeettisesta neuropatiasta kärsivien koe-eläinrottien substantia gelatinosan neuronien suurempi spontaani aktiivisuus verrattuna terveiden verrokkieläinten neuronien aktiivisuuteen. Kirjallisuuskatsausosa esittää teoreettisen taustan kokeellisessa osassa rakennettavalta laitteistolta vaadittaville ominaisuuksille ja mittausten suorittamiselle sekä aiemman keskeisen aiheeseen liittyvän tutkimuksen. Diplomityön kokeellisessa osassa pystytetään leike-patch-clamp-laitteisto substantia gelatinosan neuronien leikenäytteiden sähköfysiologisia mittauksia varten ja suoritetaan koesarja laitteiston ja tutkimushypoteesin testaamiseksi. Lopuksi arvioidaan laitteiston soveltuvuus diabeettisen neuropatian vaikutusten tutkimukseen ja esitetään jatkotutkimusmalleja neuronien aktiivisuuteen vaikuttavien TRPA1-kanavien merkityksen tarkentamista varten huomioiden kanavan mahdollisuus kipulääkityksen kohdeproteiinina.

**Avainsanat:** TRPA1, neuropaattinen kipu, patch-clamp, substantia gelatinosa, IR-DIC

**Author:** Tiina Saloniemi

**Name of the Thesis:** Diabetic neuropathy and TRPA1-channels: setting up experimental equipment and execution of electrophysiological tests on rat spinal cord slices

**Date:** 5.11.2008

**Number of pages:** 8 + 109

**Department:** Department of biomedical engineering and computational science

**Professorship:** Cognitive technology

**Code:** S-114

**Supervisor:** professor Mikko Sams

**Instructor:** FT Ari-Pekka Koivisto

**Abstract:**

Diabetic neuropathy is common for circa 50% of patients with type I or II diabetes. Neuropathic pain causes allodynia, dysesthesia, hyperalgesia and hyperpathia. The focus of the Master's thesis is on effects of diabetic neuropathy on synaptic area of primary afferent nociceptive neurons and spinal cord substantia gelatinosa neurons. The hypothesis is that diabetic neuropathy increases the activity of substantia gelatinosa neurons of diabetic test animals compared to healthy test animals. The literature part consists of theoretic background and the essential earlier research. Setting up of the tissue slice patch clamp equipment is described in the experimental part. The equipment is used to test substantia gelatinosa neurons. Future research possibilities and effects of TRPA1 ion channel are discussed. Possibility to use TRPA1 as a target protein for pharmacotherapy is also considered.

**Keywords:** TRPA1, neuropathic pain, patch-clamp, substantia gelatinosa, IR-DIC

## ALKULAUSE

Tämä diplomityö pohjautuu Orion Pharman Turun tutkimuskeskuksen reseptorifarmakologian laboratoriossa suorittamaani kokeelliseen työhön.

Tahdon kiittää työni ohjaajaa FT Ari-Pekka Koivistoa tämän todella antoisan työn mahdollistamisesta. Erityisesti tahdon kiittää häntä asiantuntevista ohjeista työni kokeellisessa vaiheessa sekä luottamuksesta ja kannustuksesta sähköfysiologisen tutkimuksen luonteeseen elimellisesti kuuluvissa välillä lähes ylivoimaisilta tuntuvissa haasteissa. Haluan välittää kiitokseni myös koko reseptorifarmakologian laboratorion henkilökunnalle mukavasta työskentelyilmapiiristä. Suuri kiitos myös FT Sanna Soinille ratkaisevaksi osoittautuneesta mahdollisuudesta hyödyntää Turun yliopiston pipetinvalmistusmateriaaleja ja pipetinvetolaitetta. Kiitokset myös työni valvojalle professori Mikko Samsille kiinnostuksesta aihettani kohtaan.

Parhaimmat kiitokseni myös kaikille rakkailleni; aviomiehelleni Mikolle ja kotijoukoilleni isille, äidille ja pikkusiskolle sekä ukille ja mummille kaikesta tuesta ja kannustuksesta. Erityiskiitos pikkusiskolleni Katriinalle valoisasta kanssaolosta jakaessamme yksiön Turussa kokeellista osaa suorittaessani. Tukijoukoista mainittakoon vielä yksi mahtava persoonallisuus, kissamme Questor, joka muistutti itsepäisen hellyydenkipeällä läsnäolollaan kirjoittamisen lomassa pidettävien taukojen välttämättömyydestä.

27.10.2008

<b>1. Johdanto</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Kirjallisuuskatsaus</b> .....	<b>5</b>
2.1. TRP-ionikanavaperhe .....	5
2.1.1. TRPA1-ionikanava .....	7
2.1.2. TRP-ionikanava kivunlievittämisen kohdeproteiinina .....	10
2.2. Selkäytimen rakenne ja toiminta .....	11
2.3. Kipu .....	13
2.3.1. Nosiseptorit .....	14
2.3.2. Kipuaistimuksen välittyminen selkäytimessä .....	16
2.3.3. Diabeettinen neuropaattinen kipu .....	18
2.4. Neuropaattisen kivun tutkimus .....	23
2.4.1. Formaliini-indusoitu kipumalli .....	24
2.4.2. Nosiseptio käyttäytymisen ja tuntohermojen toiminnan tasolla .....	25
2.4.3. Synaptisen välityksen luonne ja farmakologia .....	26
2.4.4. Endogeeniset kivunhallintareitit .....	30
2.5. Katsaus sähköfysiologisiin ilmiöihin .....	30
2.5.1. Taustaa solujen sähköisille ominaisuuksille .....	31
2.5.2. Tasapainopotentiaali .....	32
2.5.3. Lepojännite .....	33
2.5.4. Solukalvon sähköinen luonne .....	34
2.5.5. Aktiopotentiaali .....	35
2.6. Patch-clamp-menetelmät .....	36
2.6.1. Kokosolujännitelukitus .....	36
2.6.2. Perforaatio-patch-tekniikka .....	38
2.6.3. Tekniikoiden vertailua .....	39
2.7. Solujen visualisointi leike-patch-clamp-tekniikassa .....	41
2.7.1. IR-DIC-tekniikka .....	41
2.7.2. Visualisoinnin tärkeimmät edut .....	43
2.8. Patch-pipetit ja liuokset .....	47
2.8.1. Pipettien RC-ominaisuudet .....	52
<b>3. Kokeellinen osuus</b> .....	<b>54</b>
3.1. Laitteisto .....	54
3.1.1. Lähtökohtia laitteiston pystyttämiseksi .....	54
3.1.2. Laitteisto ja preparaatti .....	55
3.1.3. Optiikka .....	58
3.1.4. Mekaniikka .....	59
3.1.5. Elektroniikka .....	63
3.1.6. Laitteiston esitestaaminen .....	65

3.2. Esivalmistelut .....	66
3.2.1. Liuokset .....	67
3.2.2. Pipettien valmistaminen ja täyttö .....	70
3.2.3. Koe-eläimet .....	75
3.2.4. Leikkeiden teko .....	76
3.2.5. Muut esivalmistelut .....	80
3.3. Mittausten suorittaminen .....	82
3.3.1. Mittauksia pohjustava manuaali-patch-clamp-kokeilu .....	83
3.3.2. Kokosolumittauskonfiguraation protokolla.....	83
3.3.3. Perforaatio-patch-clamp-konfiguraation protokolla.....	93
3.4 Tulokset .....	94
3.5 Pohdinta ja johtopäätökset.....	96
3.5.1. Mittaustuloksista .....	96
3.5.2. Koelaitteiston ja leiketutkimusasetelman soveltuvuudesta diabeettisen neuropatian tutkimukseen.....	97
3.5.3. TRPA1-kanavien rooli; aiempi tutkimus ja tulevaisuus.....	99
<b>4. Yhteenveto.....</b>	<b>101</b>
<b>5. Lähteet.....</b>	<b>103</b>

## SYMBOLI- JA LYHENNELUETTELO

C	kapasitanssi
$C_m$	solukalvon kapasitanssi
I	virta
$I_{out}$	solukalvon virta ulospäin
R	resistanssi
$R_a$	access resistance; pääsyresistanssi
$R_{a, eff}$	vastuksen efektiivinen arvo
V	jännite
$V_c$	ylläpitopotentiaali
$V_m$	kalvopotentiaali
$\tau$	aikavakio
A/D	analogi-digitaali
AIDS	acquired immune deficiency syndromne
AITC	allyyli-isotiosyanaatti
AMPA	alfa-amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-isoxazoliopropionihappo
APV	DL-2-amino-5-fosfonovaleerihappo
ATP	adenosiinitrifosfaatti; nukleotidi, johon varastoitunutta suurienergiaisen fosfaattisidoksen energiaa solut käyttävät eri toiminnoissaan
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoksi)etaani-N,N,N',N'-tetraetikkahappo
CCD-camera	charce-coupled device camera
CNQX	6-syano-7-nitroquinoksaliini-2,3-dioni
DMSO	dimetyyli sulfoksidi
DRG	dorsal root ganglion; selkäytimen takajuuren tumake
EGTA	etyleeniglykolitetraetikkahappo
EPSC	excitatory postsynaptic current; eksitatorinen postsynaptinen virta
EPSP potentiaali	excitatory postsynaptic potential; eksitatorinen postsynaptinen potentiaali

GABA	gamma-aminobutyric acid; gamma-aminovoihappo; keskushermoston tärkeä inhibitorinen välittäjäaine
HEPES	4-(2-hydroxyetyyli)-1-piperatsiinietaanisulfonihappo
IC	inject current; virransyöttö
IPSP	inhibitory postsynaptic potential; inhibitorinen postsynaptinen potentiaali
IR-DIC	infrared differential-interface contrast
L-DOPA	levodopa, 3,4-dihydroksi-L-fenyylialaniini, C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> ; aminohappolääkeaine, jota käytetään yleisesti Parkinsonin taudin hoidossa
LED	light-emitting diode
Na-K-ATPaasi	natrium-kalium-ATPaasi; natrium-kaliumpumpun osana toimiva solukalvon adenosiinitrifosfataasi
NGF	nerve growth factor; hermokasvutekijä; sensoristen ja sympaattisten neuronien kasvua säätelevä tekijä
NMDA	N-metyyli-D-asparagiinihappo
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug; tulehduskipulääke
OD/ID	outer diameter/inner diameter; ulkohalkaisija/sisähalkaisija
ROE	rotary optical encoder
RR	ruthenium red; TRP-kanavan antagonisti
SG	Substantia gelatinosa; alue selkäytimen takajuuressa
STZ	streptotsotosiini
TG	trigeminal ganglion; trigeminaalinen aivohermotumake
THC	tetrahydrokannabinoidi
TRP	Transient Receptor Potential; proteiiniperheen nimi
TTX	tetrodotoksiini
VC	voltage clamp; jännitelukitus
Q-ICAM-IR	Quantitative Imaging Camera Infrared



## 1. Johdanto

Saksalaiset neurotieteilijät Bert Sakmann ja Erwin Neher mullistivat neurofysiologisen tutkimuksen esitellessään kehittämänsä patch-clamp-tekniikan vuonna 1976. Menetelmän avulla he onnistuivat mittaamaan solun ulkopuolelta sammakon lihassyiden solukalvojen yksittäisten asetyylikolinergisten kanavien kautta kulkevia ionivirtoja (Neher & Sakmann 1976). Ennen tätä menetelmää solukalvojen ionivirtoja kyettiin mittaamaan ainoastaan 100 pA tarkkuudella (Ogden 1994) ja jänniteherkkien ionikanavien toimintaperiaatteiden tuntemus perustui pitkälti olettamuksiin. Tässä varhaisessa vaiheessa patch-clamp-menetelmällä oli kuitenkin merkittäviä rajoituksia. Pipetin ja solukalvon välisen vuotovirran vähentämiseksi jouduttiin lihassyiden solukalvoa käsittelemään entsyymaattisesti. Mittausten erottelukykyä rajoitti pipetin ja solun välinen suhteellisen matala noin 50 M $\Omega$  vastus. Lopullinen läpimurto tapahtui vuonna 1981, kun Sakmann ja Neher yhteistyökumppaniensa kanssa kehittivät niin sanotun gigaliitoksen (Hamill ym. 1981). Tämän erittäin korkeavastuksisen (> 1 G $\Omega$  tai 10<sup>9</sup>  $\Omega$ ) liitoksen havaittiin syntyvän solukalvon ja pipetin välille pipetin kärjen sulkeutuessa tiukasti solukalvoa vasten, kun pipettiin lisättiin kevyt imu (cell-attached mode). Tämän kymmenien ja joissain tapauksissa jopa satojen gigaohmien suuruisen solukalvon ja lasin välisen liitoksen muodostumisen mekanismeja ei tunneta tarkasti, mutta sen keskeinen merkitys on ilmeinen. Liitoksen korkea vastus varmistaa, että lähes kaikki pipetin alaisen solukalvon osan läpäisevä virta saadaan ohjattua pipetin kautta virralle herkkään esivahvistimeen (Walz 2002).

Gigaliitos parantaa huomattavasti mittausten laatua ja erotuskykyä. Korkeavastuksinen liitos vähentää mittauksen sähköiset taustahäiriöt tasolle, joka mahdollistaa mittaustarkkuuden, jolla voidaan rekisteröidä amplitudiltaan 200 fA luokkaa olevia yksittäiskanavatapahtumia. Liitoksen mekaaninen stabiliteetti antaa edellytykset liitoksenalaisen solukalvon osan erottamiseen muusta solukalvosta ja sen ionikanavien toiminnan tarkasteluun. Myöhemmin keksittiin, että rei'ittämällä lasipipetin rajaama gigaliitoksen alainen solukalvon osa imulla, sähköpulsseilla tai näiden yhdistelmällä saavutetaan sähköinen yhteys solun sisäiseen sytoplasmaan. Tässä kokosolutilassa (whole-cell mode) voidaan solun sisäistä tilaa kontrolloida tarkasti lukitsemalla solukalvon jännite

ja samanaikaisesti mittaamalla virtaa nopeasti ja tarkasti pipetin kautta. Liitoksen mekaaninen vakaus on elintärkeää kokosolujännitelukitustekniikassa. Etenkin yksittäiskanavamittauksissa korostuu puolestaan korkeavastuksisen liitoksen häiriösignaalia vähentävä vaikutus (Scott-Ward ym. 2003). Kokosolumittauksen huuhtoutumisilmiö, jossa solun sisäinen neste sekoittuu pipetin sisäiseen liuokseen vaikuttaen näin solun toiminnallisiin mekanismeihin, onnistuttiin ratkaisemaan Hornin ja Martyn vuonna 1988 esittelemällä perforaatio-patch-clamp-menetelmällä (perforated patch-clamp) (Horn & Marty 1988). Patch-clamp-tekniikka on erityisen käyttökelpoinen sähköfysiologinen tutkimusmenetelmä ärtyvien solujen kuten neuronien, sydänsolujen, haiman  $\beta$ -solujen ja lihassolujen solukalvon sähköisten ominaisuuksien tutkimiseen (Walz 2002).

Yhteiskuntamme ikääntymisen haasteet nostavat kroonisen kivunhoidon tarpeen yhdeksi tämän hetken keskeisimmistä lääketieteellisuuden kehityshaasteista. Esimerkkeinä tällaisista pitkäkestoisia kiputiloja aiheuttavista sairauksista mainittakoon diabetes, reuma ja monet virusinfektiot sekä syövän ja AIDS:in hoitomenetelmien sivuvaikutukset. Tällä hetkellä laajassa käytössä olevia neuropaattisen kivun hoitokeinoja ovat tulehduskipulääkkeet (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug), opioidit, epilepsialääkkeet sekä trisykliset masennuslääkkeet (Levine & Alessandri-Haber 2007). Näiden lisäksi käytetään yleisesti myös kouristuksia ehkäiseviä lääkkeitä eli antikonvulsanteja (Sindrup & Jensen 2003). Tällä hetkellä käytössä olevat lääkeaineet ovat kuitenkin riittämättömiä tarjoamaan pitkäkestoista helpotusta kroonisesta kivusta kärsiville potilaille ja ne saattavat itsessään aiheuttaa käyttäjälleen kestämättömiä sivuvaikutuksia (Arreola-Espino ym. 2007). Tätä taustaa vasten on ilmeistä, että vallitsee kasvava mielenkiinto uusien farmakologisten lähestymistapojen löytämiseksi neuropaattisen kivun hoitoon.

Diplomityössä pystytettiin sähköfysiologinen leike-patch-clamp-mittalaitteisto Orion Pharman tutkimuskäyttöön ja suoritettiin laitteistolla pilottikoetyypisiä mittauksia liittyen yritystä tällä hetkellä kiinnostavaan tutkimusongelmaan; kroonisen neuropaattisen kivun lääkehoidon kehittämiseen. Työ käsittää laitteiston pystytyksen sekä mittauskäytännön kehittämisen TRPA1-ionikanavien toiminnan kartoittamiseksi kontrollikoe-eläinten sekä diabeettisesta neuropatiasta kärsivien koe-eläinten selkäydinleikkeissä. Hypoteesina oli

diabeettisesta neuropatiasta kärsivien rottien selkäytimen takajuuren substantia gelatinosa (SG, lamina II) neuronien suurempi spontaani aktiivisuus verrattuna terveiden verrokkieläinten neuroneihin. Spontaanin aktiivisuuden kasvuun vaikuttaa muun muassa TRPA1-kanavien aktiivisuus. Tähän viittaavia tuloksia on raportoitu useissa tutkimuksissa, joista keskeisimpiä esitellään työssä.

Kun spontaanin aktiivisuuden hypoteesin mukainen diabeteksesta johtuva taso todennetaan, luodaan osaltaan edellytykset diabeettisen neuropaattisen kivun hoitoon tarkoitettua lääkeainekandidaatin perforoimiselle leikkeeseen lääkeaineen vaikutusten tutkimiseksi. Näiden lääkeainekandidaatin testausta taustoittavien mittausten suorittamisessa sovellettiin patch-clamp-menetelmistä sekä kokosoluvirtamittausta että perforaatio-patch-clamp-menetelmää.

Mittauksilla oli myös tutkimusongelmaa laajempi tavoite; niiden avulla testattiin pystytetyn laitteiston toimivuutta sinänsä ja soveltuvuutta käyttökohteeseensa eli vastaavatyypisiin leiketason sähköfysiologisiin rekisteröinteihin, joiden tarve sekä selkäydin- että aivoleiketason tuleen olemaan ilmeinen muiden lääkekehitystyön eri vaiheissa hyödynnettyjen menetelmien ohella. Leikemalli tarjoaa informaatioarvoltaan korkeaa tietoa, sillä se säilyttää neuronien väliset yhteydet ja luonnollisen toimintaympäristökudoksen verrattain vahingoittumattomana vastaten näin esimerkiksi eristettyjä soluja paremmin fysiologista tilannetta.

Diplomityöni päätarkoituksena oli pystyttää laitteisto, joka palvelee yritystä monipuolisesti ja luotettavasti lääkekehitystyössä sähköfysiologisissa leiketason tutkimusten moninaisissa tulevaisuuden haasteissa.

Kirjallinen työ jakautuu kahteen osaan; kirjallisuuskatsaukseen sekä kokeelliseen osuuteen. Kirjallisuuskatsausosa esittää teoreettisen taustan rakennettavalta laitteistolta vaadittaville ominaisuuksille sekä mittausten suorittamiselle. Osassa käsitellään aluksi tutkittavaa kanavatyyppejä ja tutkimuksen kohdekudoksen rakennetta ja toimintaa. Tästä edetään kuvaamaan kipuaistimusta sekä neuropaattisen kivun ilmenemistä ja taustatekijöitä.

Seuraava luku esittelee pääpiirteissään aiemman keskeisen aiheeseen liittyvän tutkimuksen. Mittauksia ja laitteistovaatimuksia taustoitetaan esittelemällä mitattavien ilmiöiden ymmärtämisen kannalta keskeiset sähköfysiologiset periaatteet ja käytetyt mittausmenetelmät. Ennen kokeellista osuutta käsitellään vielä solujen visualisoinnissa käytetty menetelmä sekä mittapipeteiltä ja liuoksilta vaadittavat ominaisuudet.

Kokeellisessa osuudessa kuvataan kootun laitteiston osat ja laitteiston toiminnalliseen optimointiin liittyviä seikkoja. Tämän jälkeen kerrotaan seikkaperäisesti mittauksen suorittamisen vaiheet moninaisista esivalmisteluista rekisteröinnin suorittamiseen ja mittausten analysointiin. Näissä osioissa pyritään kuvaamaan ainoastaan juuri tässä työssä hyödynnettyjä esivalmistelujen ja mittausmenetelmien sovellustapoja yleisempien periaatteiden löytyessä kirjallisuusosasta. Kokeellisessa osassa esitetään tämän jälkeen mittausten tulokset ja tulosten arviointi. Pohdinta ja johtopäätökset -osassa analysoidaan työn tulokset ja kootaan yhteen työssä esiintulleet laitteiston mahdolliset kehittämistarpeet.

## 2. Kirjallisuuskatsaus

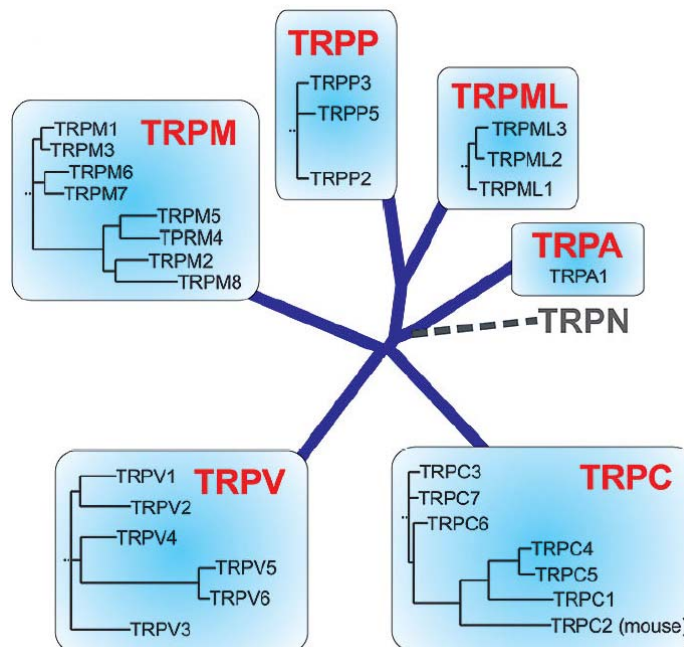
### 2.1. TRP-ionikanavaperhe

Tässä luvussa esitellään TRP-ionikanavaperhe (transient receptor potential), jolla on keskeinen fysiologinen rooli muun muassa kipuaistimuksen välittämisessä. Luvussa keskitytään kuvaamaan erityisesti sen yhtä jäsentä, neuropaattisen kivun välitykseen osallistuvaa TRPA1-ionikanavaa. Luvun lopussa kuvaillaan TRP-kanavia kivunlievityksen kohdeproteiinina toimimisen näkökulmasta.

TRP-ionikanavaperheen tunnettu historia alkaa vuodesta 1969, jolloin Cosens ja Manning TRP-mutanttia banaanikärpistä (*drosophila melanogaster*) tutkiessaan havaitsivat kärpästen nopeasti sokaistuvan vasteena kirkkaalle valolle oletetun pitkäkestoisen vasteen sijaan. Tämä johtui mutanttien fotoreseptoreissa olevan  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneja läpäisevän ionikanavan puuttumisesta (Cosens & Manning 1969). Ensimmäinen TRP-kanavien havaittu funktio oli siis fotoreseptorin keskeisenä osana toimiminen. Kaksi vuosikymmentä myöhemmin TRP-geeni kloonattiin (Montell & Rubin 1989) ja myöhemmin osoitettiin sen koodaavan  $\text{Ca}^{2+}$ -läpäisevää TRP-kationikanavaa (Hardie & Minke 1992). TRP-ionikanavaperhe käsittää koko joukon spesifisiä ionikanavia, jotka aktivoituvat kirjavasta joukosta erilaisia kemiallisia tai fysikaalisia ärsykeitä. Tästä johtuen ne toimivat monipuolisina aistimina, joiden ansiosta yksittäiset solut ja toisaalta kokonaiset eliöt havaitsevat muutoksia ympäristössään (Voets ym. 2005).

Ensimmäinen nisäkkään TRP-homologia identifioitiin vuonna 1995, mikä lisäsi huomattavasti kiinnostusta näihin kanaviin (Petersen ym. 1995). Nykyään onkin identifioitu ja karakterisoitu yli 30 TRP-perheeseen kuuluvaa kationikanavaa. Niistä suurin osa on läpäiseviä  $\text{Ca}^{2+}$ - ja osa myös  $\text{Mg}^{2+}$ -ioneille (Pedersen ym. 2005). Solunsisäinen kalsiumionien konsentraatio on keskeinen monien elintärkeiden solun prosessien kuten lihassupistuksen, välittäjäaineiden vapautumisen, solujen lisääntymisen, geenitranskription sekä solukuoleman kannalta (Berridge ym. 2000). TRP-kanavat osallistuvat solunsisäisen kalsiumin konsentraation säätämiseen tarjoamalla  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneille sisäänpääsyreittejä sytosoliin eli soluliman nestemäiseen ainekseen, vaikuttamalla  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneja soluun ajaviin voimiin ja hyvin todennäköisesti myös tarjoamalla solunsisäisiä reittejä, joiden kautta  $\text{Ca}^{2+}$ -

ioneja vapautetaan soluelimistä. Kaikkien TRP-kanavien rakenteille on yhteistä neljä identtistä alayksikköä ja kuusi solukalvon läpäisevää osaa, jotka kokoontuvat yhteen homotai heterotetrameereina muodostaen ionikanavia. Kaikki kanavat ovat kationiselektiivisiä, vaikka TRP-kanavien läpäisevyys mono- ja divalenteille kationeille vaihtelee suuresti eri kanavatyyppien välillä (Clapham 2003). TRP-kanavaperheen jäsenet muodostavat monessa suhteessa heterogeenisen ryhmän. Niitä aktivoivat esimerkiksi lämpötila, kemialliset yhdisteet, osmolaarisuus, mekaaninen stimulaatio, lipidit, valo, oksidatiivinen stressi, hapot ja feromonit (Levine & Alessandri-Haber 2007). Jotkut saattavat aktivoitua myös solunsisäisen  $Ca^{2+}$  -varaston täyttymisasteen määrääminä (Clapham 2003). TRP-kanavat eroavat toisistaan myös säätelymekanismeissaan: transkriptio, glykosylaatio, fosforylaatio sekä RNA:n silmukoituminen. Muita erottavia tekijöitä ovat ionivalikoivuus, fysiologiset funktiot ja jakautuminen eri kudoksiin elimistössä (Levine & Alessandri-Haber 2007). Aminohapposekvenssinsä perusteella TRP-ionikanavaperhe jaetaan seitsemään alaryhmään. Näistä TRPA-alaryhmä (A=ankyriini) on esitelty viimeisimpänä, ja sillä on ainoastaan yksi nisäkäillä esiintyvä jäsen TRPA1 (Pedersen ym. 2005). Kuvassa 2.1. on esitetty lajikehitykselliset suhteet ihmisellä havaittujen TRP-kanavien välillä.



**Kuva 2.1.** Kehitykselliset suhteet ihmisen TRP-kanavien superperheessä. Kuvassa TRPC2 on kädellisillä pseudogeeni eli niin sanottu kuollut geeni, joka on mutanttien takia menettänyt kykynsä ilmentyä proteiinina. TRPN-kanavia ei puolestaan ole identifioitu nisäkäillä (Voets ym. 2005).

Selkäytimen takajuuren tumakkeista on löydetty TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 ja TRPM8 TRP-kanavia. Nämä kaikki kanavat esittäytyvät sensorisina muuntimina, jotka saattavat osallistua erityyppisten ärsykkeiden alullepanemiin kipuaistimuksiin. TRPV1, TRPV2, TRPV3 sekä TRPM8 ovat termosensoreita kun taas TRPV4 ja TRPA1 ovat mekanosensoreita. Kanavista TRPV1, TRPV3, TRPM8 ja TRPA1 ovat polymodaalisia toimien myös kemoreseptoreina ja reagoiden kapsaisiiniin, endokannabinoideihin, kamferiin (Moqrich ym. 2005), mentoliin (McKemy ym. 2002, Peier ym. 2002) sekä sinappi- ja kanelipuuöljyyn (Jordt ym. 2004, Bandell ym. 2004). Lisäksi TRPV4 ja TRPA1 toimivat myös termoreseptoreina (Guler ym. 2002, Story ym. 2003, Watanabe ym. 2002). Viimeaikaisten tutkimustulosten valossa TRP-kanavilla näyttäisi olevan keskeinen rooli termalisiin, kemiallisiin ja mekaanisiin ärsykkeisiin kohdistuvassa hypersensitiivisyydessä, joka puolestaan liittyy perifeeraalisiin tulehduksiin ja neuropatioihin (Levine & Alessandri-Haber 2007).

TRP-kanavien keskeinen merkitys perustuu paitsi niiden moninlaisiin rooleihin sensorisessa fysiologiassa myös demonstraatioihin, joilla on osoitettu TRP-kanavamutaatioiden liittyvän monenlaisiin tautitiloihin kuten neurodegeneratiivisiin sairauksiin ja mukolipidoosiin (rasva-aineiden kertymiseen kudoksiin) (Montell & Rubin 1989).

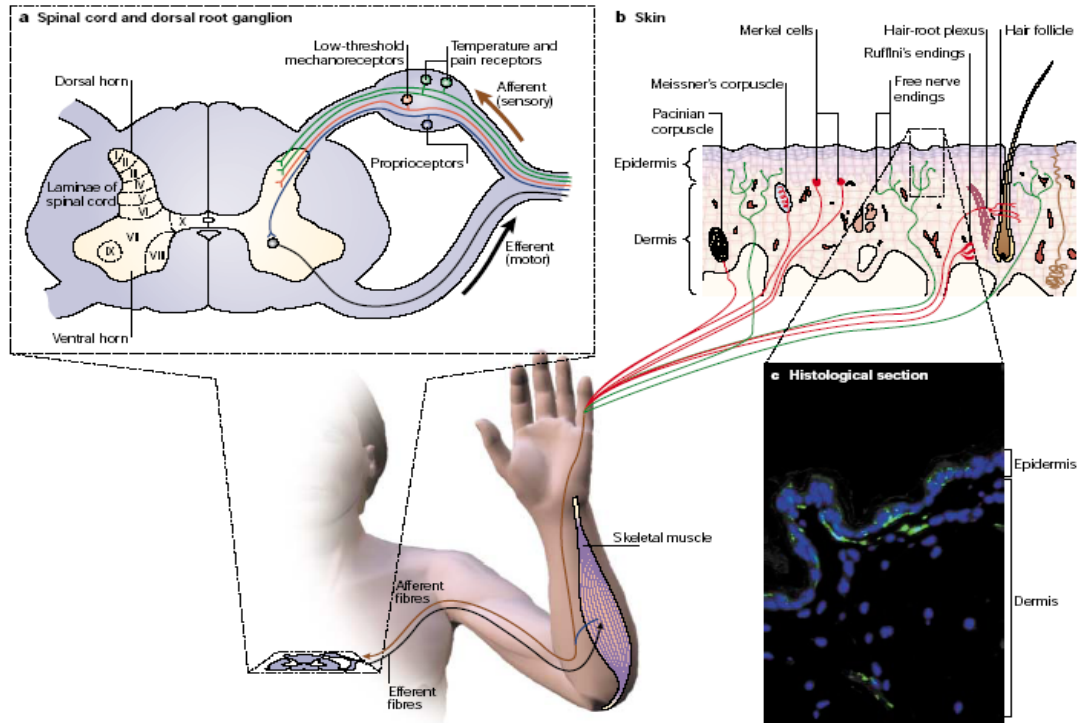
### 2.1.1. TRPA1-ionikanava

TRPA1 on tiettävästi ainoa nisäkkäissä esiintyvä TRPA-ionikanavaperheen jäsen. Niitä esiintyy karvasoluissa (Corey ym. 2004), selkäytimen takajuuren tumakkeen (DRG) sekä trigeminaalisen aivohermotumakkeen (TG) pienissä ja keskikokoisissa sensorisissa neuroneissa. Tyypillisesti TRPA1 sisältää 14 toistuvaa NH<sub>2</sub>-ankyriinipäätettä (Story ym. 2003). TRPA1 aktivoituu isotiosyanaateista (sinappiöljyn ja piparjuuren pistävä komponentti), valkosipulista (aktivoivana komponenttina allisiini), psykoaktiivisesta marihuanan komponentista (THC, tetra-hydrokannabinoidi), kanelista (kanelialdehydi) sekä bradykiniinista, mutta se on sensitiivinen myös mentolille ja kapsaisiinille (chilipippurien väkevä ainesosa) (Patapoutain ym. 2003, Story ym. 2003, Macpherson ym. 2005, McKemy ym. 2002). TRPA1-kanavan on raportoitu aktivoituvan myös haitallisen kylmästä (Story ym. 2003). Tämä on tosin kyseenalaistettu aivan hiljattain (Jordt ym.

2004). Äskettäin TRPA1-ionikanavan on myös esitetty olevan nisäkkäiden kuuloaistille välttämätön mekaanisesti sulkeutuva kanava (Corey ym. 2004). Kanava on osoittautunut myös olevansa riippuvainen sisäisestä jännitteestään, TRPA1 inaktivoituu hyperpolarisoivissa jännitteissä kuten TRPM4- sekä TRPM5-kanava (Nagata ym. 2005). Alustavasti on esitetty, että kanavan rakenteessa toistuvat ankyriiniyksiköt saattaisivat olla keskeinen taustatekijä kanavan mekanosensitiivisyydessä (Pedersen ym. 2005). Sisäkorvan reseptorisolujen karvakimpun mekaaninen poikkeuttaminen aiheuttaa kimpujen kärjissä olevien ionikanavien aukeamisen käynnistäen äänen havaitsemisen. TRPA1-proteiini saattaa itsessään olla transduktiokanavan alayksikkö. Tähän viittaavat kokeet, joissa havaittiin TRPA1:n lähetti-RNA:n ilmentyvän sisäkorvassa samanaikaisesti mekanotransduktion kanssa ja kokeet joiden mukaan eräillä koe-eläimillä TRPA1-kanavien tuhoutuminen aiheutti karvasolutransduktion inhiboitumisen (Corey ym. 2004). TRPA1-kanavan ekpressoituminen yhdessä TRPV1-kanavan kanssa ja sen oletettu toiminnallinen vuorovaikutus tämän kanavan kanssa antaisivat viitteitä TRPA1-kanavan osallisuudesta myös tulehdukselliseen kipuun (Levine & Alessandri-Haber 2007).

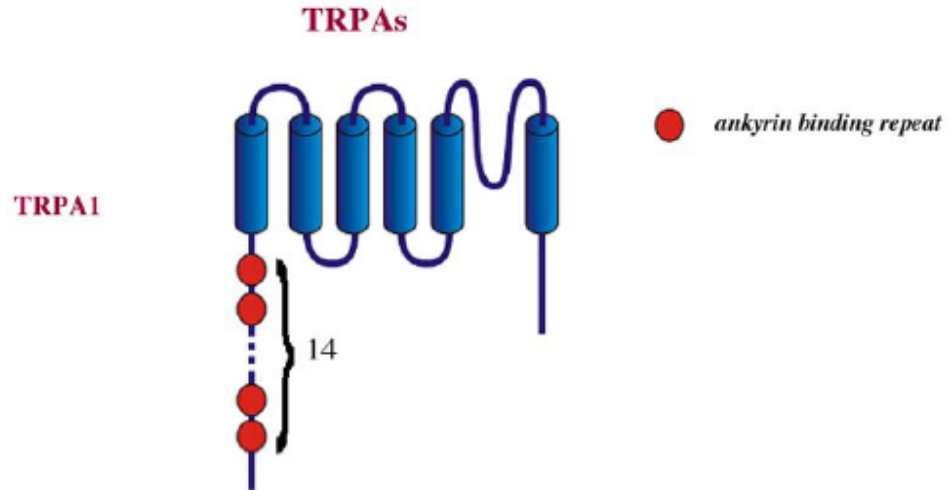
Termo-TRP-kanavien tunnusomainen piirre, joka erottaa ne toiminnallisesti muista termodynaalisesti aktivoituvista ionikanavista, on niiden kyky aktivoitua ainoastaan lämpötilan vaikutuksesta. Lisäksi yksittäinen termo-TRP-kanava on erikoistunut havaitsemaan aivan tiettyä lämpötila-aluetta. Osa termo-TRP-kanavista aktivoituukin spesifisesti kuumasta, toiset taas kylmästä. DRG:n neuronit ovat pseudounipolaarisia; yksi uloke kulkee pitkän matkan perifeeraalisiin kudoksiin kuten iholle ja lihaksiin, joissa se havaitsee sensorisia ärsykeitä, kun taas toinen haara välittää tämän informaation selkäytimen takasarveen. Proprioseptisten ja matalakynnyksisten mekanosensitiivisten neuronien päätyessä spesifisiin elimiin luurankolihasissa ja ihossa lämpötila- ja kipuerkkien neuronien aksonit kulkevat ihon epidermaalisiin ja dermaalisiin osiin päättyen vapaisiin hermopäätteisiin (Patapoutiain ym. 2003). Kuvassa 2.2. esitetään kosketusaistimuksen anatominen ja funktionaalinen järjestäminen.





Kuva 2.2. Kuvassa [a] nähdään afferenttien sensoristen ja efferenttien motoristen juurten järjestäytyminen. Motoristen neuronien solurungot sijaitsevat selkäytimen etusarvessa (ventral horn, laminae VII–IX) ja sensoristen neuronien solurungot puolestaan DRG:ssä. Kuvassa näkyy hyvin, minkälaisiin alaluokkiin sensoriset neuronit jakautuvat täällä. Työn kannalta oleellisin alue on lamina II eli SG, johon päätyvät lämpötilaa ja kipua aistivien neuronien aksonit. Kuvassa [b] punaiset syyt edustavat matalakynnyksisiä mekanoosensitiivisiä neuroneita. Vihreinä kuvassa näkyvät lämpötilaa ja kipua aistivien neuronien vapaat hermopäätteet, jotka hakeutuvat verisuonten ja karvatuppien läheisyyteen. Kuvassa [c] vapaat hermopäätteet on pan-neuronaalisella väriaineella PGP9.5 saatu näkyviin vihreinä. Vapaita hermopäätteitä löytyy sekä epidermaalista että dermaalista ihon kerroksista (Patapoutiain ym. 2003).

Yhteenvetona TRPA1-kanavista voidaan siis sanoa, että TRPA1-kanavan toiminta on  $\text{Ca}^{2+}$ -riippuvaista ja sillä on myös jännitteestä riippuvia ominaisuuksia. TRPA1-kanavat osallistuvat kivun kokemukseen, lämpötilan aistimiseen sekä mekanoosensatioon (Pedersen ym. 2005). Kuvassa 2.3. näkyy TRPA1-kanavan rakenne.



**Kuva 2.3.** Tähän mennessä ainoa löydetty TRPA-perheen jäsen on TRPA1. Kuvassa nähtävissä proteiinin N-terminaali ankyriinisitoutumisyksikköjen suuri määrä (Pedersen ym. 2005).

### 2.1.2. TRP-ionikanava kivunlievittämisen kohdeproteiinina

Tulehduksellisen ja neuropaattisen kroonisen kivun ilmentymät kuten hyperalgesia kylmälle, kuumalle tai mekaanisille stimuluksille välittyvät myelinisoimattomien pienihalkaisijaisten C-säikeiden ja keskisuuren halkaisijan omaavien myelinisoitujen A $\delta$ -säikeiden sensitisaation kautta. Nämä nosiseptiset neuronit ovat luonteeltaan joko unimodaalisia (yhdentyyppiseen fysikaaliseen ärsykkeeseen reagoivia) tai polymodaalisia (generoivat ja integroivat vasteita useammille potentiaalisesti vahingollisille termallisille, mekaanisille ja/tai kemiallisille ärsykkeille). Tulehduksellinen tai neuropaattinen kipu aiheuttaa potilaille hypersensitiivisyyttä edellä kuvatuille ärsykkeille. Näillä kiputiloilla on erilaiset syntymekanismit ja molekulääriset vaikutusreitit. Syntymekanismit vaihtelevat infektiosta, perinnöllisyydestä, kemoterapiasta, fysikaalisista vammoista ja hermomyrkyistä immuunipuolustuksen ja aineenvaihdunnan sairauksiin. Molekuläärisissä mekanismeissa vaihtelua esiintyy esimerkiksi toisiohjaajateiteissä ja mitokondraalisissa funktioissa. Tästä moninaisuudesta johtuen neuropaattisen kivun lääkehoidon kehittäminen onkin lähtökohtaisesti erittäin haastavaa. Tehokkaan hoitokeinon kehittäminen tuleekin kohdistaa nimenomaan sellaisiin ionikanaviin, jotka osallistuvat termalisten, mekaanisten ja kemiallisten ärsykkeiden havaitsemiseen sekä edistävät omalta osaltaan sekä nosiseptorien sensitisaatiota että aktivaatiota (Levine & Alessandri-Haber 2007). Tällaisten

molekyylien etsintää tuki avainlöytö, jonka mukaan kuuma ja kapsaisiini aiheuttivat nosiseptoreissa kationien sisäänvirtauksen. TRP-kanavat täyttävät nämä kriteerit kivunlievityksen kohteina. Niistä kuuden on osoitettu ekspressoituvan primääreissä afferenteissa nosiseptoreissa. Näissä kipua aistivissa neuroneissa ne toimivat muuntimina kemialliselle, termaliselle ja mekaaniselle ärsytykselle. Eräs näistä kanavista on TRPA1 (Cesare & McNaughton 1996, Oh ym. 1996, Reicling & Levine 1997, Wood ym. 1988).

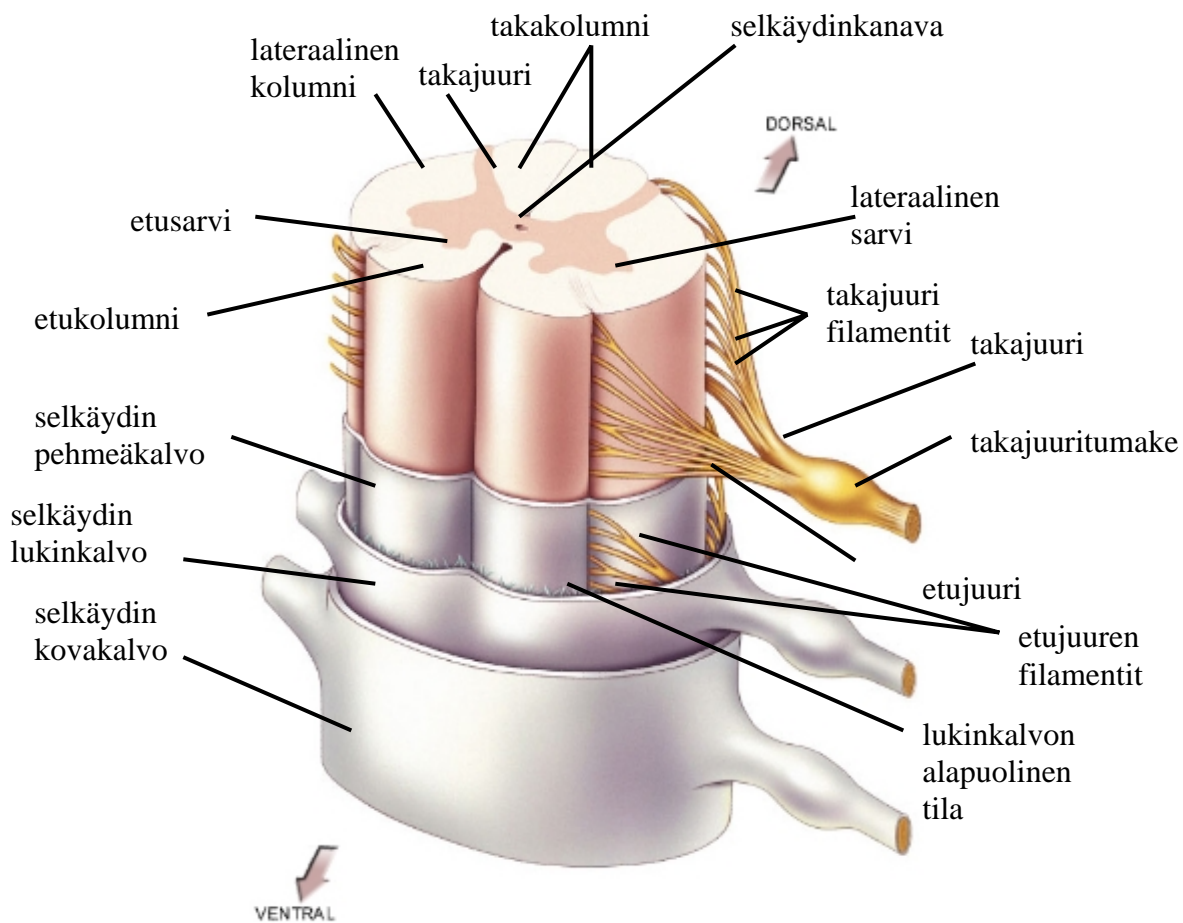
Yhteenvedona voidaan todeta viimeaikaisten tutkimusten osoittaneen TRPA1-kanavien osallistuvan paitsi kylmän aistimiseen myös mekanosensaatioon, tulehdukselliseen hyperalgesiaan ja neuropaattiseen kipuun (Namer ym. 2005, Obata ym. 2005).

## 2.2. Selkäytimen rakenne ja toiminta

Tässä luvussa tarkastellaan selkäytimen rakennetta ja toimintaa. Selkäytimen elintärkeät motoriset toiminnot kuten refleksit jätetään tarkastelun ulkopuolelle ja keskitytään kuvaamaan tutkimusaiheen kannalta oleellisia sensorisia toimintoja.

Selkäydin sijaitsee selkärangan sisällä keskuskanavassa. Selkärangan lisäksi sitä suojaavat ligamentit, selkäydinkalvot ja selkäydinneste. Kolme aivokalvojen kanssa yhtenäistä sidekudoksista selkäydinkalvoa, kovakalvo (dura mater), lukinkalvo (arachnoid mater) ja pehmeäkalvo (pia mater), reunustavat selkäydintä. Aikuisilla selkäydin ulottuu aivojen alimmasta osasta ydinjatkeesta aina toisen lannenikaman yläreunaan asti. Ulkopuolelta tarkasteltuna selkäytimessä on nähtävissä merkittävä laajentuma kaulan ja lantion kohdalla. Kaulan kohdalla olevan laajentuman kautta kulkevat hermot selkäytimen ja ylempien raajojen välillä kun taas lantioon sijoittuvasta saa alkunsa alempien raajojen hermotus. Selkäydinhermoja on ihmisellä 31 paria; kahdeksan paria kaulahermoja, kaksitoista paria rintahermoja, viisi paria lanne- ja ristihermoja sekä yksi häntähermopari. Selkäytimen rakenne on segmentaalinen. Selkäydinhermot yhdistyvät kuhunkin selkäytimen segmenttiin kahden juuren kautta. Posteriorinen eli takajuuri käsittää sensoriset aksoneit eli hermosolujen viejähaarakkeet ja anteriorinen eli etujuuri koostuu motorisista aksoneista (Tortora & Grabowski 2003).

Kaksi syvää uurretta työntyvät selkäytimen valkean aineen läpi jakaen sen oikeaan ja vasempaan puoliskoon. Selkäytimen etummainen keskihalkio on syvä ja leveä, takimmainen keskiuurre taas matala ja ohut. Harmaa aine sijaitsee selkäytimessä keskellä H-kirjaimen muotoisena valkean aineen ympäröimänä alueena, kuten voidaan nähdä selkäytimen rakennetta esittelevässä kuvassa 2.4. Harmaa aine koostuu pääasiassa neuronien soomaosista (soluruumis, hermosolun pääosa; hermosolun muu osa kuin haarakkeet), neurogliasta eli hermotukikudoksesta, aksoneista, jotka eivät sisällä myeliinituppea, välineuroneista sekä motorisista neuroneista. Myeliinituppi (ydintuppi) on joitakin hermosyitä päällystävä myeliinipitoinen päällekkäisten solukalvojen muodostama sähköä eristävä tuppi, jonka paksuus vaikuttaa syyn johtamisnopeuteen. Valkoinen aines koostuu puolestaan sensoristen neuronien, välineuronien ja motoristen neuronien myelinisoitujen ja ei-myelinisoitujen aksoneiden kimpuista (Tortora & Grabowski 2003).



Kuva 2.4. Selkäytimen poikkileikkauskuvaa (Bear ym. 2001).

Harmaassa aineessa soomaosien rykelmät muodostavat tumakkeita. Sensoriset tumakkeet ottavat vastaan informaatiota reseptoreista sensorisia hermoja pitkin kun taas motoriset tumakkeet lähettävät viestejä efektorikudoksille motoristen neuronien kautta. Efektorilla tarkoitetaan hermoimpulsseihin reagoivia lihaksia tai rauhasia. Harmaa aine kummallakin selkäytimen puolella jakaantuu kahteen sarveen, anterioriseen eli etu- ja posterioriseen eli takasarveen. Etummaisesta sisältävät somaattisten motoristen neuronien ja motoristen tumakkeiden soomaosia ja takimmaisesta somaattisia ja autonomisia sensorisia tumakkeita. Etummaisten ja takimmaisten juurien välissä sijaitsevat vielä lateraaliset eli sivuilla olevat juuret. Nämä ovat tosin vain osassa selkäytimen segmenteistä. Ne sisältävät autonomisten motoristen neuronien soomaosia, jotka vastaavat sileän lihaskudoksen, sydänlihaskudoksen ja rauhasen aktivaation säätelystä. Myös valkoinen aine on jakautunut alueisiin, joista jokainen koostuu yhteisestä lähteestä saapuneista tai yhteisen määrän mukaan omaavista samanlaista informaatiota välittävistä erillisistä aksonien kimpuista. Näitä kutsutaan nouseviksi ja laskeviksi radoiksi riippuen, välittävätkö ne informaatiota selkäydintä ylöspäin kohti aivoja vai alaspäin kohti raajoja. Sensoriset ja motoriset radat ovat jatkuvia aivojen ja selkäytimen välillä (Tortora & Grabowski 2003).

Selkäytimen tehtävä homeostaasin eli elimistön sisäisen tasapainon ylläpitämisessä on kahtalainen – hermoimpulssien välittäminen ja informaation yhteen kokoaminen. Valkoisesta materiaalista koostuvat selkäydinradat välittävät sensorisia impulsseja aivoihin ja motorisia käskyjä aivoista luurankolihasille ja muille efektorikudoksille. Selkäytimen harmaa aine vastaanottaa ja yhdistää tulevaa ja lähtevää informaatiota (Bear ym. 2001).

### 2.3. Kipu

Tässä luvussa käsitellään kipuärsyksen vastaanottamista ja välittymistä tarkastelun pääpainon ollessa selkäytimen roolissa. Kipuaistimuksen alatyypeistä esitellään neuropaattisen kivun keskeisiä muotoja ja ilmenemistä diabeettisilla potilailla.

Kipu on elintärkeä signaali, joka varoittaa meitä vallitsevasta tai uhkaavasta vaarasta ja laukaisee tarvittavia suojavasteita. Kivun kokemus saattaa ainakin osittain menettää hyödyllisyytensä muuttuessaan krooniseksi. Kroonistuessaan kipu sisältää muutoksia

selkäytimessä ja aivoissa, mutta myös huomattavaa modulaatiota kipuvasteiden syntyalueilla eli primääristen sensoristen neuronien tasolla. Kipu on monimutkainen signaali, jonka muodostumiseen vaikutetaan elimistössä monella eri tasolla. Lopulliseen kivun kokemukseen vaikuttaa kipusignaalin välittymisen ohella myös sen kognitiivinen ja emotionaalinen prosessointi aivoissa (Julius & Basbaum 2001).

### 2.3.1. Nosiseporit

Nosisepiolla tarkoitetaan niitä molekuläärisiä mekanismeja, joilla primääriset sensoriset neuronit havaitsevat kipua aiheuttavat signaalit (Julius & Basbaum 2001). Nosiseporit ovat kipureseptoreita, jotka aktivoituvat potentiaalisten kudostuhoon aiheuttajien vaikutuksesta. Kudostuho voi olla seurausta esimerkiksi altistumisesta voimakkaalle mekaaniselle stimulukselle, lämpötilojen ääripäille, happivajeelle tai tietyille kemikaaleille. Nosiseporien membraanit (solukalvot) sisältävät ionikanavia, jotka aktivoituvat tämälntyyppisistä signaaleista. Kivuliaan ärsyksen välitys tapahtuu myelinisoimattomien C-säikeiden ja A $\delta$ -säikeiden vapaissa hermopäätteissä. Useimmat nosiseporeista vastaavat sekä mekaaniseen, termiseen että kemialliseen stimulukseseen ja niitä kutsutaankin polymodaalisiksi nosiseporeiksi. Kuten mekanoreseptorit, joilla kynnys mekaanisiin aistimukseen on nosiseporeita alhaisempi, osa nosiseporeista on valikoivia vasteissaan erilaisiin stimuluksiin. Näin ollen on olemassa myös spesifisiä mekaanisia, termaalisia ja kemiallisia nosiseporeita. Nosiseporikipureseptoreita on useimmissa kudoksissa, kuten ihossa, luussa, lihaksissa, useimmissa sisäelimeissä, verisuonissa ja sydämessä. Niitä ei kuitenkaan ole aivoissa aivokalvoja lukuun ottamatta. Nosiseporin luonteen määrittää kudoksesta, jossa sen vapaat hermopäätteet sijaitsevat (Bear ym. 2001). Kipureseptoreita on vain vähän tai ei lainkaan myös munuaisissa (paitsi munuaisaltaan alueella), keuhkoissa, rustokudoksessa sekä tiiviissä luussa. Näitä elimiä ympäröivät kalvot kuten vatsakalvo, keuhkopussi, luukalvo ja aivokalvot sisältävät sen sijaan runsaasti kipureseptoreita. Näin ollen ulkoapäin aiheutuva vaurio ei helposti jää huomaamatta, kun taas alkaessaan elimestä itsestään patologinen tila kuten kasvain tai keuhkotuberkuloosin kaltainen tulehdus saattaa jatkua kauankin ennen kuin se havaitaan esimerkiksi sen levittyä elintä ympäröivään nosiseporien kattamaan kalvoon (Nienstedt ym. 1992).

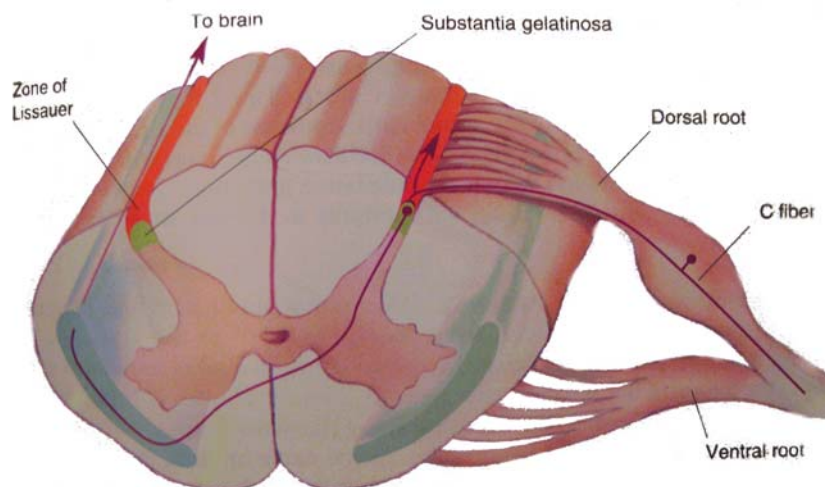
Vasteominaisuuksien perusteella hermosyyt jaetaan alatyyppeihin. Primaarinen afferentti nosiseptinen hermosäie, C-säikeet ja A $\delta$ -säikeet, ärtyvät vasteena riittävän voimakkaaseen, kivuliaaksi luokiteltavaan, ärsykkeeseen. Tavanomaisilla kosketus- ja asentotuntoon liittyvillä hermoilla puolestaan (A $\beta$ - ja A $\alpha$  -tyyppiset säikeet) ärsytyskynnys on matala. Primaaristen afferenttien nosiseptisten hermosäikeiden sekä niiden selkäytimen tasolla ja sen yläpuolella sijaitsevien projektioneuronien vasteominaisuudet muuttuvat hermovaurion tai tulehduksen seurauksena sekä pitkittyneissä kiputiloissa (Konttinen ym. 1994).

Päätä ja kehoa hermottavat syyt saavat alkunsa TG:n ja DRG:n soomaosista. Ne voidaan anatomisten ja funktionaalisten tunnuspiirteidensä perusteella jakaa kolmeen pääluokkaan. Suurimmista soomaosista lähtevät myelinisoidut nopeavälitteiset A $\beta$ -säikeet. Useimmat, mutta eivät kuitenkaan kaikki (Djouhri ym. 1998), näistä syistä aktivoituvat harmittomista ihoon, lihaksiin ja niveliin kohdistuvista ärsykkeistä. Niillä ei näin ollen ole vaikutusta kipuaistimukseen. Itse asiassa näiden suurten syiden stimulointi saattaa vähentää kipua, kuten on havaittavissa esimerkiksi, kun kivun aikana tulee tarve puristaa kovasti kättä. Kaksi muuta pääluokkaa, pienistä ja keskisuurista soomaosista lähtevät ohuesti myelinisoidut A $\delta$ - ja myelinisoimattomat hitaasti johtavat C-säikeet, sen sijaan ovat keskeisiä kivunvälityksessä (Basbaum & Jessell 2000).

A $\delta$ -nosiseptorit jakaantuvat kahteen pääluokkaan. Kumpikin kipureseptorityyppi vastaa voimakkaaseen mekaaniseen stimulusiin, mutta ne eroavat vasteissaan todella kuumiin lämpötiloihin ja tavassaan reagoida kudonvaurioon. Useimmat C-säikeiden nosiseptorit ovat myös polymodaalisia ja vastaavat sekä voimakkaisiin termaalisiin että mekaanisiin ärsykkeisiin (Raja ym. 1999). Jotkut C-säikeistä ovat unimodaalisia ja vastaavat ainoastaan kudoksille vahingollisiin lämpötiloihin. Useimmat C-säikeet reagoivat kuitenkin myös voimakkaisiin kemiallisiin ärsykkeisiin kuten happoihin ja kapsaisiiniin. Lisäksi on olemassa niin sanottuja hiljaisia tai nukkuvia nosiseptoreita, jotka vastaavat ainoastaan, kun ne altistuvat kudostuholle. Nosiseptorien eksitatorisista välittäjäaineista yleisin on glutamaatti (Schmidt ym. 1995).

### 2.3.2. Kipuaistimuksen välittyminen selkäytimessä

Erilaisten signaalinvälitysnopeuksiensa johdosta A $\delta$ - ja C-säikeet tuovat informaatiota keskushermostoon eri nopeuksilla. Niinpä ihon noiseseptorien aktivaatio johtaa kaksivaiheiseen kipuvasteeseen. Ensimmäinen terävä kipuaistimus on A $\delta$ -säikeiden välittämä, kun taas sitä seuraava pidempikestoinen intensiteetiltään heikompi kipuaistimus on seurausta C-säikeiden aktivaatiosta (Basbaum & Jessell 2000). A $\beta$ -mekanosensoriset säikeet sekä säikeiden, joiden halkaisija on pieni, soomaosat sijaitsevat segmentaalissa takajuuritusmakkeessa ja tulevat sisään selkäytimen takasarvesta. Säikeet haarautuvat heti ja edettyään zone of Lissauer -nimiselle alueelle ne synapsoituvat takasarven ulomman osan soluihin. Tätä aluetta kutsutaan substantia gelatinosaksi (SG). Tuovien eli afferenttien kipusäikeiden välittäjäaineen uskotaan olevan glutamaatti. Sen ohella nämä neuronit sisältävät myös substanssi P -peptidiä. Substanssi P:tä on rakkuloihin varastoituneena aksonipääteissä ja sitä vapautuu korkeafrekvenssisisten aktiopotentiaalisarjojen seurauksena. Noiseseptoriaksonit sisäelimestä saapuvat selkäyttimeen samaa reittiä kuin ihon tuntuun liittyvät kipuseseptorit. Selkäytimessä tapahtuukin melkoisesti näiden kahden informaatiolähteen tietojen yhdistämistä. Heijastekipu on seurausta tästä vuoropuhelusta. Tyypillisenä esimerkkinä tällaisesta kivusta on angina pectoris, joka ilmenee kun sydän ei saa riittävää määrää happea. Tällaisessa tapauksessa potilas usein paikallistaa kivun ylempään rintakehään ja vasempaan käteen (Bear ym. 2001). Kuvassa 2.5. on esitetty kipuaistimuksen välittymiseen liittyviä yhteyksiä selkäytimessä.



**Kuva 2.5. Noiseseptisten aksonien yhteydet selkäytimen tasolla (Bear ym. 2001).**



Kivun aistimus iholta välittyy vapaiden hermopäätteiden kautta. Kipureitti on hidas suhteessa nopeaan paksujen myelinisoitujen A $\beta$ -säikeiden välittämiin tuntoaistimuksiin. Spinotalaminen kipurata välittää tiedon kivusta ja lämpötilasta selkäytimen takasarven SG:sta ylöspäin. Sekundääristen neuronien aksonit risteävät välittömästi ja nousevat spinotalaamista rataa pitkin. Kuten nimikin kertoo, tämä rata synapsoi vasta talamuksen tasolla. Termaaliset nosiseptorit aloittavat aktiopotentialien laukomisen, kun 45 °C:een kriittinen raja-arvo ylittyy. Tämä lämpötila on myös kynnsarvo aistimuksen muuttumiselle lämpimästä polttavan kuumaksi ja kudokset alkavatkin palaa tässä lämpötilassa. Ronald Melzack ja Patrick Wall esittelivät 1960-luvulla kivun porttiteorian. Sen mukaan tietyt takasarven neuronit, joista lähtee nouseva aksoni spinotalaamista rataa pitkin eksitoituvat yhtä lailla suurihalkaisijaisten sensoristen aksonien ja myelinisoimattomien kipuaksonien vaikutuksesta. Nouseva neuroni myös inhiboituu välineuronin toimesta, joka puolestaan eksitoituu eli ärtyy isojen sensoristen aksonien toimesta ja inhiboituu kipuaksonin vaikutuksesta. Näin ollen tilanteessa, jossa ainoastaan kipuaksoni aktivoituu, ärtyy nouseva neuroni maksimaalisesti ja täten nosiseptiset signaalit saavuttavat aivot. Mikäli suuri mekanosensorinen aksoni aktivoituu, samanaikaisesti aktivoituu välineuroni ja nosiseptiset signaalit vaimentuvat (Bear ym. 2001).

Selkäytimen alueista substantia gelatinosa (SG, lamina II) on se, johon useimmat myelinisoimattomat primääriset afferentit saapuvat. Tältä alueelta alkaa nosiseptisen informaation prosessointi (Santos ym. 2007). Primääristen afferenttien hermopäätteiden ärtyminen johtaa neuronin reseptorikalvon depolarisaatioon aiheuttaen aktiopotentialiaaleja (transduktio), jotka kulkevat selkäytimen takasarveen transmissioksi kutsutun prosessin kautta. Täällä C- ja A $\delta$  -säikeistä vapautuu mitä ilmeisimmin glutamaattia, joka ionotrooppisten non-NMDA-tyyppisten reseptorien kautta välittää viestin transsynaptisesti edelleen selkäytimen hermoihin (Yoshimura & Jessell 1990). Vapautuvat neuropeptidit saattavat diffundoitua laajalle alueelle takasarven alueella. Tätä ilmiötä kutsutaan volyymitransmissioksi, joka aiheuttaa neuronien väliaineessa muutoksia myötävaikuttaen kivun pitkittymiseen (Konttinen ym. 1994). SG:n eli lamina II:n neuronit muodostavat paikallisia neuronien välisiä ratoja, jotka integroivat luultavasti informaatiota useista eri

säietyypeistä ja välittävät tämän informaation projektioneuroneille lamina I:ssä ja takajuuren syvemmillä alueilla (Yoshimura & Jessell 1990).

Hermosäikeet siis jaotellaan vasteominaisuuksiensa, ei aiheuttamiensa tuntemusten mukaisesti. Tästä syystä primaarista afferenttia nosiseptista hermosäiettä ei tulisi kutsua kipuhermoksi. Kivun säätelyssä tärkeitä ovat paikalliset selkäytimen tasolla vaikuttavat estävät kytkennät. Kosketus- ja asentohermoista lähtee paikallisia kollateraaleja paikallisiin estäviin välineuroneihin. Nämä puolestaan voivat vaikuttaa presynaptisesti primaarisiin afferentteihin nosiseptisiin neuroneihin niiden välittäjäainevapauttamista vähentäen tai postsynaptisesti vähentämällä projektioneuronien ärsyyntyvyyttä eli hyperpolarisoimalla niitä. Selkäytimen segmentaalisisissa estävissä välineuroneissa toimivat välittäjäaineina paitsi endogeeninen proenkefaliini ja prodynorfiiniperheen opioidit myös etenkin keskuhermoston toiminnan kannalta erityisen keskeinen estävä välittäjäaine gamma-aminovoihappo (GABA). Näin ollen GABAB-reseptorin agonistia eli myötävaikuttajaa baklofeenia onkin sovellettu neuropaattisen kivun hoitoon (Konttinen ym. 1994).

### 2.3.3. Diabeettinen neuropaattinen kipu

Luvun alussa hieman määritellään, mitä diabeettisella neuropaattisella kivulla tarkoitetaan. Tämän jälkeen esitellään sen epidemiologiaa sekä kliinistä oireistoa. Lopuksi tutustutaan vielä diabeettisen neuropatian patogeneesiin eli kehitymisen taustalla oleviin tekijöihin, erityisesti oksidatiiviseen stressiin.

Diabetes mellitus on yksi yleisimmistä kroonisista sairauksista ja vaikuttaa yli 100 miljoonan ihmisen elämään maailmanlaajuisesti. Erään arvion mukaan noin 60 % näistä potilaista kehittyy diabeettinen neuropatia (Galer ym. 2000). Neuropaattinen kipu liittyy kipuaistimuksiin, joissa kipu esiintyy, vaikka nosiseptistä stimulaatiota ei olekaan. Useimmiten tällainen kipu liittyy vaurioihin perifeeraalisissa hermoissa tai niissä keskushermoston osissa, jotka osallistuvat nosiseptisen informaation käsittelyyn (Berne ym. 2004). Erään määritelmän mukaan kyseessä katsotaan olevan diabeettinen neuropatia, mikäli oireiden ja löydösten perusteella muiden taustasyiden ollessa poissuljettu voidaan

katsoa diabetes-potilaan tilan johtuvan ääreishermoston tai autonomisen hermoston toimintahäiriöstä (104 www-sivu).

Neuropaattiselle kivulle tyypillisiä piirteitä:

- dysestesia; spontaanit epämieluisat tuntemukset
- allodynia (kuvaus tuonnempana)
- hyperalgesia (kuvaus tuonnempana)
- hyperpatia; pitkittyneet kipuvasteet
- epänormaali purkauksellinen aktiivisuus eli niin sanottu tuikekipu

(Konttinen ym. 1994).






Neuropaattista kipua esiintyy 8-26 % diabeettisista potilaista (Ziegler 2008). Backonja esittää, että 45 % diabetes-potilaista kärsii diabeettisesta neuropatiasta jossain taudin vaiheessa Hänen mukaansa 4-5 %:lla potilaista esiintyy kivuliasta neuropatiaa (Backonja 1999). Diabeettinen neuropatia on heterogeeninen neurodegeneratiivinen komplikaatio, joka liittyy sekä tyypin I (nuoruusiän) että tyypin II (aikuistyypin) diabetes mellitukseen. Koska kliinisiä oireyhtymiä on suuri määrä, ei ole yhtä selkeää universaalista määritelmää diabeettiselle neuropaattiselle kivulle. Tämä saattaa olla myös yksi syy siihen, että arviot diabeettisen neuropaattisen kivun yleisyydestä vaihtelevat. Diabeettiseen neuropatiaan kuuluu ilmentymiä somaattisessa ja/tai autonomisessa perifeeraalisessa hermostossa. Nämä vaihtelevat kestoltaan ja intensiteetiltään suuresti. Neuropaattista kipua saattaa esiintyä melkein missä tahansa kudoksessa (Schmidt ym. 1995). Yleisimmin käytetty luokittelu erottaa nopeasti palautuvan ja pitkäkestoisen symmetrisen polyneuropatian ja toisaalta yhden pesäkkeen tai useamman pesäkkeen neuropatian (Sima ym. 1997). Tämä kipu käsittää monenlaisia sensorisia, motorisia ja autonomisia oireita (Serra 1999).

Riippumatta vaihtelevista taustatekijöistään neuropaattinen kipu on useimmiten spontaania, jatkuvaa, polttavaa, kohtauksittaista ja saa alkunsa erilaisista mekaanisista ja termaalisista ärsykkeistä (Attal & Bouhassira 1999). Diabeettinen neuropatia tunnetaankin usein sietämättömän voimakkaana hoitoon vastaamattomana kipuna, johon saattaa kuulua sensorimotorista neuropatiaa. Neuropaattinen kipu on vain neurologisen toimintahäiriön

oire, ei tauti itsessään. Hiljattain on identifioitu diabeettiselle neuropatialle tunnusomaisia veren virtauksen ja neuronaalisen iskemian oireita (Cameron ym. 2001, Sheetz & King 2002).

Distaalinen sensorinen neuropatia on tyypillisen diabeettisen neuropatian tyyppi. Kivulias diabeettinen neuropatia luokitellaan akuuttiin ja krooniseen sekä ärsykkeeseen laukaisemaan tai ärsytyksestä riippumattomaan (Vinik 2005). Kuhunkin näistä luokista kuuluu useita diabeettisen neuropatian alatyyppiä (Schmidt ym. 2003). Taulukossa 2.1. on esitelty eräs kliiniseen oireistoon perustuva diabeettisen neuropatian luokittelu (104 www-sivu).

**Taulukko 2.1. Diabeettisen neuropatian tyypit kliinisen oireiston mukaisesti jaoteltuna (104 www-sivu).**

Oireyhtymä	Sensomotorinen polyneuropatia	Akuutti kivulias neuropatia	Diabeettinen amyotrofia	Moneuropatit	Moneuropatit
Kliininen kuva					
Tunnon heikentyminen	+ -> ++	+	0	++	++
Kipu	0 -> +++	+++	+ -> +++	++	0 -> ++
Jänneheijasteet	↓	↓	↓	+	+
Lihsatrofia ja heikkous	0 -> +++	+ -> ++	+++	+ -> ++	0 -> ++
Autonomiset häiriöt	+ -> ++	Voi esiintyä	Voi esiintyä	Voi esiintyä	Voi esiintyä
Esiintyvyys	Yleinen	Suhteellisen harvainen	Suhteellisen harvainen	Suhteellisen harvainen	Suhteellisen harvainen

Diabeettinen neuropatia alkaa yleensä oireettomana ääreishermoston yleistyneenä toimintahäiriönä. Yleisimmin havaittuja varhaisia diabeettisen neuropatian merkkejä ovat muutokset hermojohtonopeuksissa ja hermon värähdysamplitudissa tai autonomisen hermoston toimintahäiriöstä kertova alentunut sydämen sykevaihdtelu, joka voidaan todentaa erilaisissa kliinisissä testeissä. Taudin vaikeutuessa alkaa esiintyä kliinisiä oireita ja myöhemmässä vaiheessa komplikaatioita. Yksilötasolla sekä oireet että taudinkulku ovat vaihtelevia ja tunto-oireita saattaa esiintyä kaikissa asteissa. Neuropatia ei etene vääjäämättä huonompaan suuntaan. Ääreishermoston sensoriset oireet voidaan edelleen jakaa hermoston hypofunktiosta eli esimerkiksi kipu- ja lämpöaistimuksen tai asentotunnon muutoksista tai hyperfunktiosta eli esimerkiksi kivuista ja parentesioista johtuviksi. Yleensä hypofunktio-oireet esittäytyvät lievempinä kuin hyperfunktio-oireet (104 www-sivu).

Normaalisti nosiseptorit reagoivat vain voimakkaisiin ärsykkeisiin, jotka aiheuttavat kudostuhoa. Aiemmin vahingoittuneet tai tulehtuneet iho, nivelet tai lihakset ovat kuitenkin epätavallisen herkkiä. Kevytkin kosketus vaikkapa palaneelle iholle saattaa aiheuttaa äärimmäistä kipua. Tämä ilmiö tunnetaan nimellä hyperalgesia. Hyperalgesia saattaa esittäytyä alentuneena kipukynnyksenä, kivuliaan stimuluksen kasvaneena intensiteettinä tai jopa itsestään syntyvänä kipuna. Primäärinen hyperalgesia ilmenee vaurioituneella alueella, mutta sitä ympäröivätkin alueet saattavat herkistyä sekundääriseen hyperalgesian kautta. Ihon vaurioituessa vapautuu useita kemikaaleja. Suuri osa näistä vaikuttaa nosiseptorien ärtymiseen. Tällaisia herkistäviä kemikaaleja ovat esimerkiksi bradykiniini, prostaglandiinit,  $K^+$ -ionit ja substanssi P. Vamma-alueita ympäröivien alueiden sensitisoituminen substanssi P:n vaikutuksesta on eräs sekundääriseen hyperalgesiaan johtava tekijä. Keskushermoston toimintamekanismit itsessään osallistuvat sekundääriseen hyperalgesiaan. Mekanoreseptiivisten  $A\delta$ -säikeiden aktivoituminen kevyestäkin kosketuksesta kudovaurion jälkiseurauksena saattaa aiheuttaa kipua (Berne ym. 2004).

Nosiseptorit eivät reagoi ainoastaan akuuttiin kipuun, vaan niillä on vasteensa myös pitkäkestoisiin ja patologisiin kiputiloihin. Allodynia tunnetaan ilmiö, jossa tavallisesti harmiton kosketus tai termalinen stimulus aiheuttaa kipua (Berne ym. 2004). Allodynia

voi olla seurausta kahdesta erilaisesta tilasta: selkäytimen kivunvälittäjäneuronien kasvaneesta reagoinnista (sentraalinen sensitisaatio) tai nosiseptorien aktivaatiokynnysten alenemisesta (periferaalinen sensitisaatio). Sentraalisessa sensitisaatiossa kipu voi syntyä ei-nosiseptisten primääristen sensoristen säikeiden aktivaatiosta. Periferaalinen sensitisaatio syntyy, kun nosiseptoripäätteet altistuvat kudonvauriotuotteille ja tulehdukselle. Tällaisia tuotteita ovat solunulkoiset protonit, arakidonihappo ja muut lipidien eli rasva-aineiden aineenvaihduntatuotteet, serotoniini, bradykiniini, nukleotidit sekä NGF (nerve growth factor) eli hermokasvutekijä. Nämä kaikki ovat vuorovaikutuksessa sensoristen hermopäätteiden reseptorien ja ionikanavien kanssa (Basbaum & Jessell 2000). Selkäydintason muutoksia on tutkittu hermosäikeiden regeneraatiomerkkiaineiden avulla. Näin on osoitettu vaurioituneiden hermojen regeneraation lisäksi myös funktionaalista ja rakenteellista synaptisten ja ei-synaptisten yhteyksien syntyä, johon allodynia saattaa liittyä kevyen kosketuksen johtaessa kipuun signaalivirran kosketustuntoa välittävistä radoista kipuratoihin siirtymisen kautta (Konttinen ym. 1994).

Diabeettisen neuropatian patogeneesi on epäselvä. Varhaisvaiheessa aineenvaihdunnalliset tekijät saattavat olla keskeisessä roolissa, kun taas myöhemmässä vaiheessa korostuvat verenkiertoon liittyvät tekijät. Fokaalisten eli tietylle rajatulle alueella rajoittuvien neuropatioiden kehittymisessä verenkiertohäiriö sekä painetila ovat keskeisessä asemassa. Koeolosuhteissa aiheutettuun neuropatiaan liittyvässä aineenvaihdunnallisessa häiriötilassa veren sokeripitoisuuden kohoaminen aiheuttaa muun muassa sorbitolin kertymisen, alentuneen Na-K-ATPaasi-aktiivisuuden sekä solunsisäisen natriumpitoisuuden nousun (104 www-sivu).

Oksidatiivinen stressi on tila, joka seuraa solun tai kudoksen epäonnistuessa saattamaan metabolisessa toiminnassa syntyviä vapaita radikaaleja myrkyttömään muotoon. Diabetekselle on tunnusomaista krooninen hyperglysemia, joka aiheuttaa solun metabolian säätelyn häiriintymisen. Tällöin glukoosin metaboloitumisen sivutuotteena syntyvät vapaat radikaalit kumuloituvat solussa ja tuloksena on oksidatiivinen stressitila. Mikäli solun antioksidantit eivät kykene poistamaan vapaita radikaaleja, nämä vahingoittavat solun proteiineja, lipidejä ja nukleiinihappoja. Sekä krooninen että akuutti hyperglysemia

aiheuttaa perifeeraalisessa hermostossa oksidatiivista stressiä, joka edesauttaa diabeettisen neuropatian kehittymistä. Oksidatiivisen stressin proteiinien toimintaa tuhoava vaikutus johtaa alentuneeseen biologiseen aktiivisuuteen, joka näyttäytyy energiametabolian ja solusignaaloinnin heikkenemisenä ja jopa solukuolemina. Diabeettisen neuropaattisen kivun estoon onkin esitetty antioksidatiivisten hoitokeinojen kehittämistä (Vincent ym. 2004). Diabeteksessa neuroneita ei ainoastaan menetetä, vaan myös niiden kyky lisääntyä on heikentynyt, etenkin pienihalkaisijaisissa hermosyissä (Polydefkis ym. 2003). Diabeettisessa neuropatiassa solujen rappeutumista ja uudistuotantoa tapahtuu jatkuvasti samanaikaisesti (Apfel 1999). Taudin edetessä tämä dynaaminen tila siirtyy yhä enemmän kohti neuronien rappeutumista uudistuotannon heikentyessä. Kyvyttömyys neuronien uudistuotantoon on suorassa yhteydessä diabeettisen neuropatian asteeseen. Uudistuotannon vähenemiseen vaikuttavia mekanismeja ovat heikentynyt insuliinitoiminta, kasvutekijäsystemien heikkeneminen, proteiinkinaasi C:n tiettyjen muotojen väheneminen sekä oksidatiivisen stressin aiheuttama Schwannin solujen (hermotukisoluja ääreishermostossa, voivat muodostaa myeliinitupen) toiminnan heikkeneminen. Oksidatiiviseen stressiin vaikuttaminen edellyttää neuronien rappeutumisen estämistä sekä uudistuotannon edistämistä. Diabeettinen neuropatia on todennäköisesti seurausta mikrovaskulaaristen ja neuronaalisten heikkouksien yhteisvaikutuksesta. Oksidatiivinen stressi vaikuttaa merkittävästi näihin heikkouksiin ja voi olla suora seuraus hyperglysemialle. Myös akuutti glukoosinpuute johtaa perifeeraalisten neuronien tuhoon mekanismien kautta, jotka ainakin osittain liittyvät oksidatiiviseen stressiin. Näin ollen antioksidatiivisen stressin estämiseen tarkoitetut antioksidantit ovat keskeisiä kehittämiskohteita neuropaattisen kivun ja muidenkin diabeettisten komplikaatioiden ehkäisyssä (Vincent ym. 2004).

#### 2.4. Neuropaattisen kivun tutkimus

Luvun tarkoituksena on antaa yleiskuva tähänastisesta neuropaattisen kivun mekanismien ymmärtämiseen ja lääkehoidon kehittämiseen tähtäävästä tutkimuksesta.

#### 2.4.1. Formaliini-indusoitu kipumalli

Formaliinimalli kehitettiin yli kolmekymmentä vuotta sitten kivun määrittämiseen ja kipulääkkeiden vaikutusten arviointiin koe-eläintutkimuksissa. Kokeessa 0,5–5 % pitoisuuteen laimennettu formaliiniliuos (aktiivinen ainesosa formaldehydi) injektoidaan jyrsijäkoe-eläimen kypälään. Kipuun liittyvät vasteet havaitaan tällöin kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä, karkeassa vaiheessa jyrsijä nostaa kypälänsä ylös, nuolee sitä ja kavahtaa kipuaistimusta. Tämä vaihe kestää noin kymmenen minuuttia oireiden asteittain vähentyessä. Toinen vaihe kestää noin 30–60 minuuttia (Abbot & Franklin 1995, Tjolsen ym. 1992). Sen uskotaan johtuvan aktiivisuusriippuvaisesta selkäytimen takajuuren herkistymisestä (Tjolsen ym. 1992, Coderre ym. 1990, Woolf 1983). Kipumallin ensimmäiseen vaiheeseen voidaan vaikuttaa puudutteilla, kun taas perinteiset tulehduskipulääkkeet vaikuttavat lähinnä toiseen vaiheeseen (Abbadie ym. 1997, Malmberg & Yaksh 1992).

Vaikka kipumalli oli pitkään yleisessä käytössä, ei formaliinin tarkkaa vaikutusmekanismia tunnettu. McNamara ja kumppanit osoittivat vuonna 2007 ilmestyneessä tutkimuksessaan, että formaliini aktivoi afferentteja sensorisia neuroneja C-säikeiden spesifisen ja suoran TRPA1-kationikanavan toiminnan kautta (McNamara ym. 2007). Formaliinin aiheuttama TRPA1-kanavan aktivoituminen muistuttaa mekanismiltaan muutamien muidenkin TRPA1-agonistien aktivaatiota, jossa kanavaproteiini aktivoituu sytoplasman puoleisten kysteiini- ja lysiinijäännösten kovalenttien modifikaatioiden kautta (Hinman ym. 2006, Macpherson ym. 2007). TRPA1-kanava osoitettiin tällä tutkimuksella käyttökelpoiseksi kohteeksi uudenlaisten kipulääkkeiden kehitykselle (McNamara ym. 2007). Arreola-Espinon ja kumppanien viime vuonna julkaistussa tutkimuksessa osoitettiin suun kautta annetun melatoniinin, pääasiassa nisäkkään käpylisäkkeessä tuotettavan hormonin, kyky vähentää formaliinilla indusoitua nosiseptiota ja tuntoaistin allodyniaa streptotsotosiinilla diabeettisiksi indusoiduilla rotilla. Melatoniini osoittautui aineeksi, jolla voidaan vähentää formaliinin vaikutuksesta ilmenneitä tuntoaistimuksen allodyniaa ja epänormaaleja kivun prosessointimekanismeja, jotka ovat tyypillisiä diabeettisille rotille (Arreola-Espino ym. 2007). Melatoniinin vaikutus on ymmärrettävä, sillä se on vapaiden radikaalien jätteiden



kerääjä elimistössä, jolla on epäsuoria vaikutuksia antioksidatiivisten entsyymien ekspressoitumisen ja aktivoinnin kautta (Klepac ym. 2006, Nishida 2005).

#### 2.4.2. Nosisseptio käyttäytymisen ja tuntohermojen toiminnan tasolla

Courteixin, Eschalierin ja Lavannen vuonna 1992 julkaistussa tutkimuksessa altistettiin rottia, joihin oli indusoitu diabetes injektoimalla niihin streptotsotosiinia (STZ), systemaattisesti erilaisille kivuttomille sekä kipua potentiaalisesti aiheuttaville ärsykkeille. Näissä ärsykkeissä olivat edustettuina niin mekaaniset, termaaliset (kylmä ja kuuma) kuin kemiallisetkin stimulut. Rottien vasteita näihin ärsykkeisiin seurattiin neljän viikon ajan samanaikaisesti tarkkailemalla niiden kliinisiä oireita kuten painon, ruumiin- ja ihonlämmön sekä liikkumisen kehittymistä. Samalla seurattiin myös hyperglysemian astetta. Tutkimuksessa havaittiin diabeettisten rottien reaktiokynnysten laskevan kivuliaan kuumalle (44 C° ja 46 C° ärsykkeet), ei-kivuliaalle lämpötiloille (38–42 C°) sekä mekaanisille ärsykkeille (painetesti rotan käpäliin). Tämä voidaan tulkita käyttäytymistason todisteena hyperalgesiasta ja allodyniasta. Hyperalgesiaan viittaavat oireet kehittyivät asteittain tilastollisesti merkittäviksi noin kahdessa viikossa. Varsinaisesta hyperalgesiasta voitiin puhua neljän viikon kuluttua sairauden indusoimisesta. Variaatiot herkkyydessä kipuärsykkeille alkoivat kehittyä samaan aikaan painon kertymisen, ihon lämpötilan alenemisen, hännän liikuttamisessa havaittujen lihassurkastumien ja virtsaamistiheyden kasvun sekä psykogeenisen runsaan veden juomisen kanssa. Kaiken kaikkiaan 55–90%:lla neljä viikkoa diabeteksen indusoimisen jälkeen testatuista rotista esiintyi häiriöitä sekä vasteissa kivuliaisiin että kivuttomiin nosisseptisiin ärsykkeisiin (Courteix ym. 1993).

Ahlgren ja kumppanit julkaisivat tutkimuksensa STZ-indusoiduista diabeettisista rotista vuonna 1992. Heidän keskeinen havaintonsa safeenahermon sensorisista neuroneista oli, että sensoristen hermojen fysiologiset ominaisuudet kuten spontaanin aktiivisuuden aste ja spontaanisti aktivoituvien säikeiden prosentuaalinen osuus kaikista sähköisesti aktivoituvista syistä sekä yksittäisten C-säikeiden mekaaninen ja termalinen ärsytyskynnys, eivät poikenneet terveillä rotilla mitatuista. Sen sijaan diabeettisten rottien C-säikeiden nosisseptoreissa havaitut kasvaneet ja pidentyneet vasteet saattavat viitata diabeettisilla rotilla havaittuihin mekaanisen nosisseptisen ärsytyskynnyksen alenemiseen

käyttäytymiskokeissa. Myös A $\delta$ -säikeiden vasteiden väheneminen saattaa osaltaan vaikuttaa hyperalgesian kehittymiseen. Muutokset A $\beta$ -säikeissä eivät sen sijaan osoittautuneet merkityksellisiksi diabeettisten rottien muuttuneen nosiseption kannalta. Neuronien kasvanut laukomistiheys ärsykkeen ylläpitämisen ajan sekä sen jälkeen saattaa osaltaan selittää hyperalgesiaa mekaanisille ärsykkeille sekä pidentyneen dysestesian eli tuntoaistimuksen esiintymisen ilman tuntoaistimusta. Näistä molemmat ovat keskeisiä oireita ihmisten diabeetisessa neuropatiassa. Myös ryhmän demonstroimat seikat kuten mekaanisesti ja termalisesti hiljaisten C-säikeiden prosentuaalisen osuuden väheneminen ja A $\delta$ -säikeiden mekaanisen ärsytyskynnyksen aleneminen saattavat myötävaikuttaa diabeettisten rottien käyttäytymiskokeissa esiin tulleeseen mekaanisen nosiseptisen ärsytyskynnyksen alenemiseen (Ahlgren ym. 1992).

#### 2.4.3. Synaptisen välityksen luonne ja farmakologia

Santos ja kumppanit julkaisivat vuonna 2007 tutkimuksen, jossa he tehokkaasti identifioivat synaptisesti yhteydessä olevia välineuroneita rottien selkäydinleikkeistä ja luonnehtivat niiden eksitatorisia eli kiihdyttäviä ja inhibitorisia eli estäviä funktioita. He testasivat 1500 SG-alueen neuronin suorittaen tiivisliitoksia kokosolurekisteröintejä soluun kiinnittyvää stimuloititekniikkaa hyödyntäen. Neuroneista 102 luokiteltiin monosynaptisiksi ja ne synapsoivat lamina I-III-alueelle. Yllättävän suuri osa välineuroneista oli eksitatorisia (89 neuronin) ja niissä välittäjäaineena toimi glutamaatti. Ainoastaan 15 välineuroneista oli inhibitorisia. Neuronit edelleen luokiteltiin niiden sisäisten aktiopotentialien laukomisominaisuuksien perusteella. Keskeisin tulos oli kuitenkin, että sensorinen integraatio SG:n sisäisissä neuronaalisissa yhteyksissä on eksitatoristen välineuronien dominoimaa. Tällä neuronaalisten yhteyksien järjestäytymisellä on luultavasti keskeinen rooli nosiseptisessä koodauksessa. Eksitatorinen prosessointi on nimittäin pääsääntöisesti intralaminaarista erotuksena inhibitiolle, joka on ensisijaisesti interlaminaarista. Santos ja kumppanit osoittivat moduloimalla välittäjäaineiden vapautumista ja stimulaation intensiteettiä, että neuronien synaptinen viestintä tapahtuu etupäässä AMPA- ja osittain myös kainaatireseptorien välityksellä. He myös näyttivät, että BAPTA-pohjainen solunsisäinen liuos säilytti neuronien fysiologisen laukomisrytmin. Tästä voidaan päätellä neuronien olevan Ca<sup>2+</sup>-ionien puskuroimia

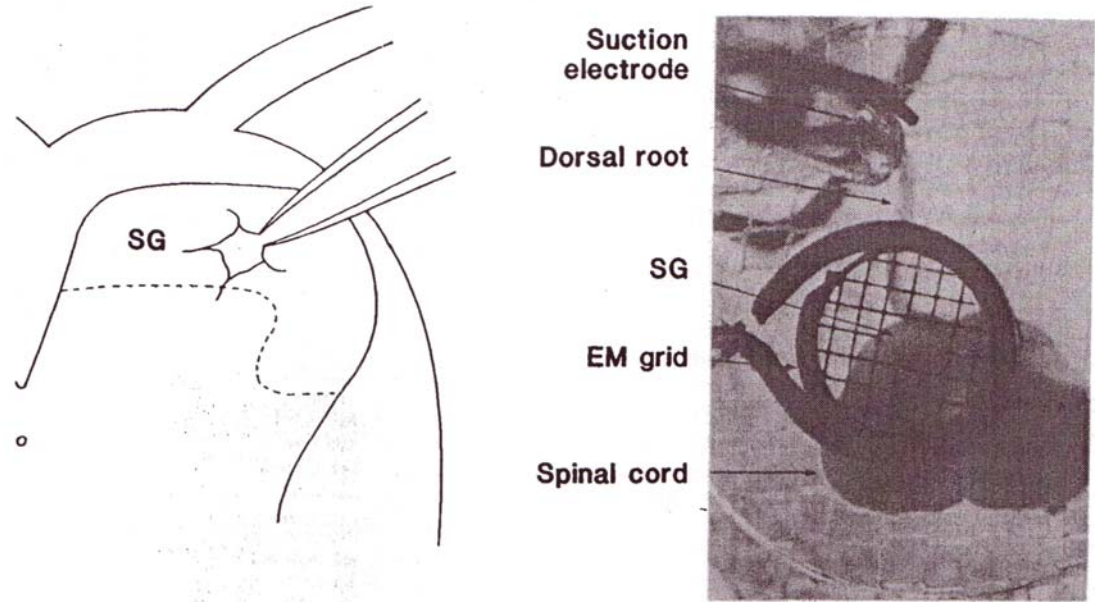
normaaliolosuhteissa ja että laukomisrytmi on suuresti riippuvainen  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneista. Tämä sopii hyvin kuvaamme SG:n alueella olevien TRP-kanavien luonteesta. Tässä tutkimuksessa kokosolumittaukset suoritettiin perforaatiopatch-menetelmällä terveistä rotista (Santos ym. 2007).

Ennen Kosugin ja kumppanien vuonna 2007 julkaisemaa tutkimusta kukaan ei ollut osoittanut TRPA1-kanavien roolia SG:n synaptisen toiminnan säätelyssä. Työssään he tutkivat rottien selkäydinleikkeistä SG:n alueen neuroneita kokosoluvirtamittauksella rekisteröiden TRPA1-kanavien aktivoitumisen vaikutuksia synaptiseen välitykseen. He superfusivat rottien selkäydinleikkeisiin sinappiöljyn pääainesosaa allyyli-isotiosyanaattia (AITC), kaneliöljyä ja allisiinia ja havaitsivat näissä kaikissa tapauksissa spontaanien eksitatoristen postsynaptisten virtojen (EPSC) frekvenssin ja amplitudin selvästi kasvavan. AITC:n avulla aikaansaatu voimistuminen EPS-virtojen frekvenssissä ja amplitudissa oli resistenttanti nopeisiin jänniteherkkiin natrium-kanaviin vaikuttavalle tetrodotoksiinille (TTX) ja  $\text{La}^{3+}$ -ioneille. Lisättäessä glutamaattireseptoriantagonisteja synaptinen aktiviteetti tyrehtyi kokonaan ja  $\text{Ca}^{2+}$ -ionien puuttuessa liuoksesta synaptinen aktiivisuus heikkeni huomattavasti. Ruthenium red vähensi sekä amplitudia että frekvenssiä edellä kuvatuissa synaptisissa vasteissa. Näiden tulosten ja muutamien muidenkin TRPA1-ionikanavan karakterisiin ominaisuuksiin liittyvien farmakologisten altistusten ansiosta ryhmä vakuuttui TRPA1-kanavien läsnäolosta paitsi SG:n neuronien presynaptisissa päätteissä glutamaatin vapautumisen edesauttajina myös primaaristen afferenttien selkäytimen inhibitorisiin välineuroneihin päätyvien neuronien päätteissä. Tämä sentraalinen sensoristen signaalien modulaatio saattaa olla myötävaikuttamassa fysiologisiin ja patologiisiin kipuaistimukseen (Kosugi ym. 2007).

Yoshimuran ja kumppanien vuonna 1993 julkaistussa tutkimuksessa SG:n synaptisia ominaisuuksia tutkittiin erilaisilla farmakologisilla altistuksilla. Työn päätulos on yhtenevä aiempien tutkimusten kanssa siltä osin, että primaaristen afferenttien A $\delta$ -säikeiden aktivointi johti glutaminergisiin EPS-virtoihin. Aktivointi johti myös glysinergisiin ja GABA-ergisiin IPS-virtoihin. Jo tässä vaiheessa havaittiin siis myös inhibitorisen välityksen oletettavasti keskeinen rooli selkäytimen nosiseptisessä välityksessä. NMDA-

reseptorien todettiin tutkimuksessa osallistuvan EPS-virtojen myöhempisiin komponentteihin. Tutkimuksessa todettiin siis sekä IPS-virtoja synnyttävien inhibitoristen välineuronien että NMDA-komponenttien moduloinnin olevan mahdollinen vaikutuskohde SG:n neuronien eksitaation asteeseen ja myös sen keston. Kuvassa 2.6. on havainnollistettu heidän koeasetelmaansa leiketetasolla. Huomattava piirre on, että tässä käytettiin sokkopatch-clamp-menetelmää. Leike ja siten SG-alue oli visualisoitu, mutta yksittäisten neuronien ääri viivoja ei, joten gigaliitoksen tekeminen SG:n neuroneihin tehtiin sokkona (Yoshimura & Nishi 1993). Yoshimura osoitti Jesselin kanssa jo tätäkin aiemmassa vuonna 1990 julkaistussa, erilaisia farmakologisia altistuksia selkäydinleikkeeseen hyödyntävässä tutkimuksessa, että A $\delta$ - ja C-säikeet käyttävät L-glutamaattia tai sille läheistä aminohappoa SG:ssa synapsoidessaan. Tämän välittäjäaineen postsynaptiset vaikutukset välittyvät pääasiassa NMDA-reseptorien vaikutuksesta. Se, etteivät 6-syano-7-nitroquinoksaliini-2,3-dioni (CNQX) ja DL-2-amino-5-fosfonovalerihappo (APV), onnistui kokonaisuudessaan blokkamaan L-glutamaatin aikaansaamaa depolarisaatiota SG- neuroneissa, nostaa esiin mahdollisuuden, että solunulkoisesti lisätty L-glutamaatti aktivoisi non-NMDA reseptorin. Tämä olisi siis eri reseptori kuin se, jonka kautta kulkee synaptisesti välitetty afferentti välittäjäaine. Jotkut EPSP:t siis ovat ja toiset taas eivät sensitiivisiä eksitatoristen aminohappoantagonistien ehkäiseville sivuvaikutuksille. Eli muut kuin eksitatoriset aminohapot saattavat näytellä roolia nopeassa synaptisessa transmissiossa. Kun verrattiin synnytettyjen EPS-potentiaalien latensseja välittymisnopeuteen ja stimulusintensiteettiin ja primaarisen afferentin neuronin aktivoitumiseen vaadittavaan stimulusintensiteettiin, havaittiin että lyhytlatenssiset EPSP:t välittyvät A $\delta$ -säikeissä ja pitkälatenssiset EPSP:t välittyvät C-säikeiden toimesta. Tutkimuksessa Yoshimura hyödynsi solunsisäisiä mittauksia ja osoitti primaarisen afferentin syötön aikaansaavan sekä nopeita että hitaita EPSP:itä takajuuren neuroneissa (Yoshimura & Jessell 1990). Baba ja kumppanit puolestaan tutkivat rottien selkäydinleikkeissä vuonna 1998 muskariinireseptorien agonistien ja asetylikoliiniesteraasi-inhibiittorien vaikutuksia GABA-ergisiin IPS-virtoihin, joiden ajatellaan olevan osallisia selkäydintason antinosiseptioon (Yoshimura & Nishi 1995, Baba ym. 1998). Työssään Baba ja kumppanit vahvistivat selkäytimen muskariinireseptorien

agonistien sekä asetyylikoliiniesteraasin inhibiittorien antinosiseptisen vaikutuksen (Baba ym. 1998).



**Kuva 2.6. Kaavamainen kuva koasetelmasta (Yoshimura & Nishi 1993).**

Toisaalta eräs erittäin mielenkiintoinen tuore tutkimus esittelee yhden mahdollisen lääkeainekandidaatin. Ishii ja kumppanit ovat tänä vuonna julkaistussa artikkelissaan kuvanneet dexmedetomidin, korkeasti selektiivisen  $\alpha_2$ -adrenoseptori agonistin ominaisuuksia. Selkäytimen takajuuren pintakerroksissa  $\alpha_2$ -adrenoseptorien tiheys on todella suuri (Roudet ym. 1994, Stone ym. 1998). Tutkimus on suoritettu rottien selkäydinleikkeistä kokosolu-patch-clamp-tekniikalla. Faber ja kumppanit ovat vuonna 1998 julkaistussa tutkimuksessaan osoittaneet  $\alpha_2$ -adrenoseptorien agonistien lamaannuttavan A- ja C- afferenttien säikeiden NMDA-reseptorivälitteisen eksitatorisen postsynaptisen potentiaalin (Faber ym. 1998). Dexmedetomidini hyperpolarisoi kalvopotentiaaleja selkäytimen takajuuren neuroneissa  $\alpha_2$ -adrenoseptorien kautta tapahtuvan G-proteiinivälitteisen  $K^+$ -kanavien aktivaation kautta. Tutkimuksen päälöytö on siis dexmedetomidinin oletettava osallisuus antinosiseptioon selkäytimessä (Ishii ym. 2008).

#### 2.4.4. Endogeeniset kivunhallintareitit

Tutkimustietoa laskevien noradrenergisten, serotoniinisten ja dopaminergisten ratojen vaikutuksista nosiseptioon on raportoitu jo pitkään, mutta vasta aivan viime vuosina näiden vaikutusten solutason mekanismit ovat alkaneet selvitä. Tamaen ja kumppanien tutkimuksessa tarkasteltiin dopamiinin vaikutusta tuntoinformaation välitykseen sekä käyttäytymisen tasolla että kokosolu-patch-clamp-mittauksissa SG:n alueella. Dopamiinilla ei ollut merkittävää vaikutusta miniatyyristen eksitatoristen postsynaptisten sähkövirtojen frekvensseihin tai amplitudeihin. Dopamiinin pääasiallinen vaikutus näkyikin dopamiinin taipumuksessa indusoida postsynaptisiin SG-neuroneihin ulospäin suuntautuvia virtoja. Tämä tapahtui G-proteiinivälitteisen kaliumionikanavien aktivaation välityksellä D2-tyyppisten dopamiinikanavien kautta. Tamaen tutkimuksen lisäarvo aikaisempaan dopamiiniagonistien tutkimukseen on, että se tarjoaa tietoa niistä solutason mekanismeista, jotka taustoittavat dopamiinin indusoimaa antinosiseptiota ja näin ollen tuovat astetta lähemmäs mahdollisuuden dopamiiniagonistien ja L-DOPA:n hyödyntämiseen kliinisessä neuropaattisen kivun hoidossa (Tamae ym. 2005). Laskevien noradrenergisten ratojen roolia on käsitelty esimerkiksi Sonohatan ja kumppanien tutkimuksessa, joka julkaistiin vuonna 2003. Heidän keskeisin löydöksensä oli, että noradrenaliini vaikuttaa toisaalta presynaptisesti heikentäen kipua aiheuttavien stimulusten aiheuttamia EPS-virtoja sekä postsynaptisesti indusoiden vastaavanlaisen ulospäin suuntautuvan virran kuin dopamiinin  $\alpha_2$ -adrenoreseptorien kautta aiheuttaen näin antinosiseptisiä vaikutuksia (Sonohata ym. 2003).

Tutkimuksessaan Jiang ja kumppanit osoittivat muun muassa kokosolu-patch-mittauksilla, että somatostatiini aktivoi kaliumkanavia saaden aikaan postsynaptisen hyperpolarisaation aikuisten rottien SG-alueen neuroneissa. Vastoin aikaisempia tutkimustuloksia he osoittivat, että somatostatiini ei vaikuta synaptisen välityksen presynaptiseen komponenttiin. Täten somatostatiinin kipua vähentävä vaikutus ei ole yhteydessä EPS-virtoihin (Jiang ym. 2003).

#### 2.5. Katsaus sähköfysiologisiin ilmiöihin

Tässä luvussa käsitellään neuronin sähköfysiologisen toiminnan ymmärtämisen kannalta oleellisia solukalvon sähköisiä ominaisuuksia.

### 2.5.1. Taustaa solujen sähköisille ominaisuuksille

Ihmisessä ja eläimessä sähköiset signaalit kulkevat ionien välityksellä. Neurofysiologisesti tärkeimpiä varauksenkuljettajia ovat monovalentit kationit  $K^+$ ,  $Na^+$  ja anioneista  $Cl^-$  sekä divalentti kationi  $Ca^{2+}$ . Solukalvon yli liikkueensa nämä ionit aikaansaavat sähköisen potentiaalin muutoksia kalvon yli. Potentiaalierot ovat luonteeltaan primäärisiä signaaleja, joiden tehtävänä on välittää biologisia viestejä yhtä lailla solun sisällä, solusta soluun kuin myös kehon osasta toiseen. Ionien liikkeet solubiosysteemeissä selittyvät diffuusion ja sähköisen potentiaalin avulla (Johnston & Miao-Sin Wu 1995).

Ionit eivät ole tasaisesti jakaantuneet biologisissa systeemeissä. Esimerkiksi  $K^+$ -ionien konsentraatio on useimpien eläinten soluissa huomattavasti korkeampi solun sisällä kuin solunulkoisessa tilassa. Sitä vastoin  $Na^+$ - ja  $Ca^{2+}$ -ionien konsentraatiot ovat suurempia solun ulkopuolella. Nämä erot ionien jakaantumisessa aiheuttavat konsentraatiogradientteja. Termodynamiikan peruslakien mukaan lämpötilasta riippuva ionien satunnaisliikehdintä jakaa ionit tasaisesti liuoksessa ja niiden nettovirta tapahtuu suuremman konsentraation alueelta pienemmän konsentraation alueelle. Tämä ilmiö tunnetaan diffuusiona. Diffuusiota tapahtuu kunnes ionit ovat tasaisesti jakautuneet solukalvon molemmiin puolin, mikäli mitään muita tekijöitä ei oteta huomioon. Tämä edellyttää siis tietyn ionityypin konsentraatiogradienttia solukalvon yli sekä kalvon läpäisevyyttä kyseiselle ionityypille (Johnston & Miao-Sin Wu 1995).

Koska ionit kantavat sähkövarausta, niiden liikkeeseen vaikuttaa konsentraatiogradienttien lisäksi myös sähkökentät. Useimmissa kehon osissa biologisten molekyylien nettovaraus on nolla; tietyssä tilavuudessa positiivisten ja negatiivisten varausten lukumäärä on siis yhtä suuri. Tärkeä poikkeus tästä neutraliteetista on yksittäisen solun solukalvo. Useimmat solukalvot ovat läpäiseviä joillekin ioneille ja toisille taas eivät, mistä seuraa sähkökenttä solukalvon yli. Tällä sähköisellä potentiaalierolla solukalvon ulko- ja sisäpuolen välillä on määräävä vaikutus ionien liikkeisiin solukalvon kanavien ja huokosten läpi (Johnston & Miao-Sin Wu 1995).

Solukalvon keskeisimmät rakenneosat fosfolipidit koostuvat hydrofiilisestä polaarista päästä ja hydrofobisesta ei-polaarisesta hännästä. Fosfolipidit muodostavat solukalvon kahtena päällekkäisenä molekyylikerroksena siten, että hydrofobiset hännät sijaitsevat vastakkain ja hydrofiiliset päät osoittavat solunulkoiseen ja solunsisäiseen tilaan päin. Tämä fosfolipidikaksoiskerros eristää tehokkaasti solunsisäisen ja ulkoisen tilan ja mahdollistaa näin ollen omalta osaltaan lepojännitteen ja aktiopotentialin. Toimiakseen tarkoituksenmukaisella tavalla solukalvojen tulee säädellä lävitseen kulkevien ionien liikumista. Tämä tapahtuu erilaisten proteiinimolekyylien muodostamien ionikanavien avulla, jotka läpäisevät fosfolipidikaksoiskerroksen tarkasti määrättyllä kanavatyyppille ominaisella tavalla kunkin kanavan päästäessä lävitseen määrättyjä ionilajeja (Hille 2001). Solukalvon läpäisevät makromolekyylit muodostavat ionikanavia, jotka mahdollistavat hydrofiilisen kanavan auetessa varauksenkuljettajina toimivien ionien passiivisen kulkemisen solun sisä- ja ulkopuolisen tilan välillä. Ionikanavan toiminta määräytyy pääasiassa kahden seikan perusteella: ionityypin, joka kanavan läpäisee sekä signaalin, joka kanavan saa avautumaan ja sulkeutumaan. Useimmiten toimivan ionikanavan muodostavat neljästä kuuteen samanlaista proteiinimolekyyliä, joiden keskelle jää aukko, jonka kautta ionit virtaavat. Valikointi kanavan läpäisevien ja läpäisemättömien ionien kesken toteutuu sekä proteiinimolekyylien rajaaman aukon koon mukaan että aukkoa reunustavien proteiinimolekyylien karakterististen aminohapporyhmien ominaisuuksien perusteella. Esimerkiksi kaliumkanavat ovat valikoivasti läpäiseviä  $K^+$ -ioneille, natriumkanavat  $Na^+$ -ioneille sekä kalsiumkanavat  $Ca^{2+}$ -ioneille. Ionikanavien ohella myös solukalvon läpi yltävillä proteiinimolekyyleillä, ionipumpuilla, on kriittinen rooli neuronien välisessä viestinnässä. Neurofysiologiassa keskeisimmät näistä ovat natrium-kalium -pumppu ja kalsiumpumppu. Kuljettaakseen näitä tiettyjä ioneja solukalvon läpi ne hyödyntävät ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) hajottamisessa vapautuvaa energiaa. Adenosiinitrifosfaatti on nukleotidi, jonka suurienergisestä fosfaattisidoksen energiaa solut hyödyntävät muutoinkin eri toiminnoissaan (Bear ym. 2001).

### 2.5.2. Tasapainopotentiaali

Jonkin ionin osalta tasapainotilanne on saavutettu, kun diffuusio ja sähköiset voimat ovat yhtä suuret mutta vastakkaisuuntaiset ja tämän ionin virtaus kalvon läpi on pysähtynyt.



Lepopotentialilla tarkoitetaan sitä sähköistä potentiaaliero, joka tasapainottaa ionisen konsentraatiogradientin. Kun tunnetaan tietyn ionin varaus ja konsentraatio solun ulko- ja sisäpuolella sekä lämpötila, voidaan sen tasapainopotentiaali määrittää laskennallisesti Nerstin yhtälön avulla (kaava 2.1.) (Sherman-Gold 1993). Tämä tasapainopotentiaali saavutetaan, mikäli solukalvo on läpäisevä ainoastaan kyseiselle ionityypille. Fysikaalisessa tilanteessa neuronit ovat kuitenkin läpäiseviä useammalle ionityypille (Bear ym. 2001). Jokaisella ionilajilla on ominainen tasapainopotentiaali, joilla on hermosolun toiminnan kannalta erityisen keskeinen merkitys. Solukalvojen signaalit syntyvät näiden potentiaalien asettamissa rajoissa. Kaikki solukalvon signaalit perustuvat tähän samaan periaatteeseen, jonka mukaisesti tiettyjen spesifisten kanavien auetessa niiden ioneihin kohdistuvat sähköinen voima ja pitoisuuseron aikaansaama vaikutus asettuvat tasapainotilaan siirtäen solukalvon potentiaalia kohti kyseisen ionilajin tasapainopotentiaalia. Reaalisessa tilanteessa useampia ionilajeja lävitseen päästävät kanavat ovat auki yhtäaikaaisesti, jolloin kalvopotentiaali asettuu arvoon, joka on eräänlainen keskiarvo näiden eri ionilajien tasapainopotentiaaleista (Kaila 1985).

$$\frac{RT}{z_A F} \ln \frac{[A_u]}{[A_s]} \quad (2.1.)$$

**Nerstin kaava.** Tässä  $R$  on kaasuvakio,  $T$  absoluuttinen lämpötila,  $z_A$  on ionin  $A$  valenssi ( $\text{Na}^+$  ja  $\text{K}^+$ , +1;  $\text{Cl}^-$ , -1) ja  $F$  on Faradayn vakio. Ionin konsentraatio solun ulkopuolisessa tilassa on  $[A_u]$  ja sisäpuolella  $[A_s]$ . Tämä tasapainotila on sellainen, että diffuusiovirta korkeammasta pitoisuudesta pienempään on sama kuin sähkökentän aiheuttama ohminen virta (Hille 2001).

### 2.5.3. Lepojännite

Lepotilassa solun sisä- ja ulkopuolen välillä vallitsee jännite-ero. Sisäpuoli on negatiivisesti varautunut suhteessa ulkopuoleen ja tästä aiheutuu lepopotentiaali, joka vallitsee solussa aina kun se ei generoi impulsseja. Solukalvon lepojännite kuvaa siis dynaamista tasapainotilaa, jossa ei tapahdu sähkövirran nettovirtausta kalvon yli. Tyypillisellä hermosolulla sen suuruus on noin -65 mV. Lepojännite määräytyy sellaisten solunsisäisten

ja -ulkopuolisten ionien konsentraatioiden mukaan, joille solukalvo on läpäisevä. Mikäli tietyn ionin konduktanssi on määräävä, lepojännite on lähellä tämän ionin Nerstin potentiaalia. Koska tyypillinen lepotilassa oleva solukalvo on paljon läpäisevämpi kaliumioneille kuin natrium-, kalsium- tai kloridi -ioneille, lepokalvojännite on hyvin lähellä kaliumin tasapainopotentiaalia (Sherman-Gold 1993). Jos lepävä solukalvo olisi läpäisevä ainoastaan kaliumille, solukalvon lepojännitteen arvo olisi -80 mV. Mitattu tyypillisen neuronin -65 mV:n suuruinen lepojännite johtuu siitä, että solukalvo on lepotilassa myös jonkin verran läpäisevä natriumioneille. Solukalvon suhteellinen läpäisevyys kaliumille on siis korkea ja natriumille matala. Kaliumkanavien valikoiva läpäisevyys onkin avaintekijä lepojännitteessä ja sitä kautta neuronien toiminnassa. Lepojännite voidaan laskea Goldmanin yhtälöllä. Kaavassa otetaan huomioon solukalvon suhteellinen läpäisevyys eri ionityypeille neuronin ollessa lepotilassa. Kun tiedetään lepotilassa olevan solukalvon läpäisevyyden  $K^+$ -ionille olevan 40 kertaa suurempi kuin  $Na^+$ -ionille, voidaan lepopotentiaalın suuruus laskea käyttämällä  $K^+$ - ja  $Na^+$ -ioneille approksimoituja solunsisäisiä ja ulkopuolisia konsentraatioita. Tällaisen approksimaation tuloksena saadaan määriteltyä kokeellisestikin todennettu -65mV:n lepojännitteen arvo (Bear ym. 2001).

#### 2.5.4. Solukalvon sähköinen luonne

Solukalvo vastaa sähköisesti passiivisilta ominaisuuksiltaan vastuksen (resistanssi R) ja kondensaattorin (kapasitanssi eli varautumiskyky C) rinnankytkentää. Rinnakkaiset kapasitanssit ja vastukset summataan yhteen (Sherman-Gold 1993). Elektrofysiologiassa onkin keskeistä ymmärtää, minkälaisen ajasta riippuvan vasteen kalvon yli tietty virta synnyttää. RC-kykentojen ajallinen asettumien noudattaa eksponentiaalista muutosta aikavakiolla  $\tau = RC$  (Voipio 2004). Solukalvon kondensaattoriominaisuus johtuu siitä, että epätasapaino negatiivisten ja positiivisten varauksen suhteen solukalvon molemmiin puolin näyttäytyy elektrostaattisena vetovoimana solukalvon yli. Sisäpuolen negatiiviset ja ulkopuolen positiiviset varaukset vetävät toisiaan vastavuoroisesti puoleensa vain alle 5 nm ( $23 \text{ \AA} = 2,3 \text{ nm}$  (Hille 2001)) paksuisen solukalvon läpi (Kaila 1985). Biologisilla solukalvoilla on korkea sähköinen kapasitanssi,  $1,0 \text{ Mf/ cm}^2 (=0,01 \text{ pF/ } \mu\text{m}^2)$ , joka on suora seuraus yllä kuvatuista kalvojen molekuläärisistä dimensioista. Solukalvojen kapasitanssi

määrää, kuinka monen ionin (varauksen) tulee kulkea ja kuinka nopeasti niiden täytyy edetä tietyn sähköisen signaalin syntymiseksi. Yleisesti kapasitanssi hidastaa minkä tahansa virran jännitevastetta tunnusomaisella aikavakiolla  $\tau$ , joka riippuu kapasitanssin RC:stä ja jokaisesta efektiivisestä rinnakkaisesta vastuksesta (Hille 2001).

#### 2.5.5. Aktiopotentiaali

Neuronien viestintä perustuu aktiopotentiaaleihin, jotka laukeavat vaadittavan ärsytyskynnyksen ylittyessä (hermosolutyypistä riippuen noin 5-20 mV muutos aksonin kalvopotentiaalissa positiiviseen suuntaan). Hermosolukalvon ollessa lepotilassa siinä on runsaasti avoimia kaliumkanavia ja kalvopotentiaali onkin lepotilassa lähellä kaliumin tasapainopotentiaalia. Aktiopotentiaalin aikana jänniteherkät natriumkanavat avautuvat, mikä siirtää kalvopotentiaalin hetkeksi lähelle natriumionin tasapainopotentiaalia, noin arvoon +20 mV. Tällöin solun sisäpuoli on hetkellisesti positiivinen ulkopuoliseen kudospesenteeseen nähden (Bear ym. 2001). Solun synnyttämät aktiopotentiaalit ovat aina kooltaan ja kestoaltaan vakioisia riippumatta kynnyksen ylittäneen ärsyksen suuruudesta. Tätä kutsutaan kaikki tai ei mitään -periaatteeksi. Jänniteherkkyyden lisäksi aktiopotentiaaliin osallistuvien ionikanavien toimintaa määrittää niiden toimintanopeus eli kinetiikka. Hermosolun aksoni ei kykene laukomaan uusia aktiopotentiaaleja aivan välittömästi edellisen aktiopotentiaalin laukeamisen jälkeen sulkeutuneiden natriumkanavien pysyessä hetken aikaa suljettuina. Tämä aikaväli tunnetaan nimellä refraktaal aika. Aktiopotentiaali on kestoaltaan noin kahden millisekunnin mittainen ja suuruudeltaan noin 100–120 mV. Se ei heikkene edetessään pitkin hermosolun aksoneita. Neuronien välittämä viesti sisältyykin neuronin aktiopotentiaalien laukomisen kaavaan ja frekvenssiin (Kaila 1985).

Aktiopotentiaalin johtumisnopeuteen vaikuttavat aksonin paksuus (paksut kuljettavat ohuempia huomattavasti nopeammin) sekä gliasolujen muodostama sähköisenä eristeenä toimiva myeliinituppi (myelinisoidut kuljettavat selvästi nopeammin). Myeliinitupelisissa aksoneissa sähköisen signaalin passiivinen johtuminen on saltatorista eli hyppivää; vain 1–2 mm mittaisten tuppiosien välisissä kuroumissa on jänniteherkkiä natriumkanavia ja näin ollen vain niissä syntyy aktiopotentiaali (Kaila 1985). Viesti neuronista toiseen kulkee

synapsien kautta. Useimmat keskushermoston synapsit välittävät viestit kemiallisesti. Presynaptisen välittäjäaineen vapautumisen postsynaptisessa membraanissa aiheuttamaa äkillistä depolarisaatiota kutsutaan eksitatoriseksi postsynaptiseksi potentiaaliksi (EPSP). Vastaavasti äkillinen postsynaptisen membraanin hyperpolarisaatio, jonka aiheuttaa presynaptinen välittäjäaineen vapautuminen, on nimeltään inhibitorinen postsynaptinen potentiaali (IPSP). Vastaanottavan solun kaikista synapseista kullakin ajanhetkellä vastaanotettujen eksitoivien ja inhiboivien signaalien yhteisvaikutus ratkaisee aktiopotentiaalin laukeamisen. Samalla neurotransmitterivälittäjäaineella voi olla erilaisia postsynaptisia vaikutuksia riippuen siitä mihin reseptoriin se sitoutuu (Bear ym. 2001).

## 2.6. Patch-clamp-menetelmät

Tässä luvussa esitellään ne patch-clamp-menetelmät, joita hyödynnettiin diplomityön pilottikoetyypisissä selkäydinleike-patch-clamp-mittauksissa. Luvun lopussa vertaillaan näiden tekniikoiden mittausteknisiä vahvuuksia ja heikkouksia.

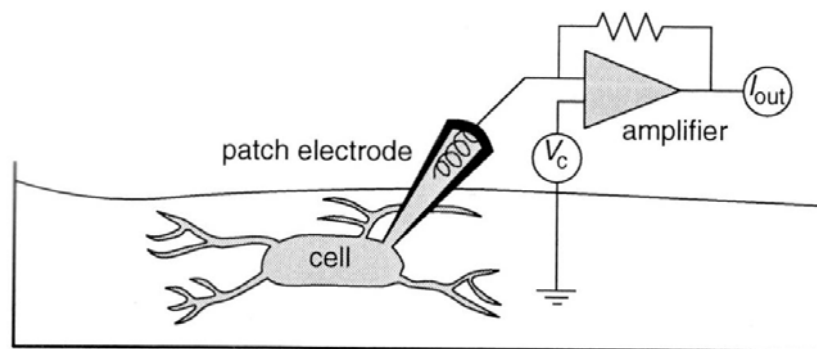
### 2.6.1. Kokosolujännitelukitus

Jännitelukitustekniikassa solukalvon potentiaali pidetään tietyssä vakioarvossa samalla kun kalvon läpi kulkevaa virtaa mitataan. Välttämättä ei olla kiinnostuneita virrasta sinänsä, vaan solukalvon johtavuudesta ja sen taustalla olevasta ionikanava-aktiivisuudesta. Pitämällä kalvopotentiaali vakiona voidaan varmistua siitä, että mitattu virta on suoraan verrannollinen tutkimuskohteena olevaan johtavuuteen (Sherman-Gold 1993).

Jännitelukitus on yksi parhaista keinoista ionikanavien toiminnallisten ominaisuuksien tutkimiseen. Siinä aiheutetaan solukalvon jännitteeseen asteittaisia muutoksia, jotka saavat kalvon kanavat siirtymän eri toiminnallisten tilojensa välillä. Näitä siirtymiä voidaan seurata muutoksina solukalvon virroissa. Muutoksien ajallinen asettuminen eri tilojen välillä sisältää paljon informaatiota ionikanavien porttitoiminnasta. Tämän lisäksi jännitelukitusta voidaan käyttää eri kanavapopulaatioiden valikoivaan aktivointiin. Näin voidaan esimerkiksi biologisilla tai farmakologisilla manipulaatioilla merkittävä spesifisiä kanavia identifioida ja tutkia yksityiskohtaisesti. Perinteisesti tätä menetelmää on käytetty jänniteherkkien ionikanavien toiminnan tutkimiseen, mutta sitä on alettu hyödyntää myös

ligandiherkkien kanavien, synaptisten potentiaalien ja solujen eritystoiminnan eli eksosytoosin tutkimiseen (Jackson 1997).

Kokosolujännitelukitusmekaniikassa käytetään yhtä ja samaa elektrodiä samanaikaisesti sekä jännitteen  $V$  kontrollointiin että virran  $I$  mittaamiseen (kuva 2.7.) Sarjaresistanssikompensaationa tunnetun menetelmän kautta pyritään eliminoimaan virhe, joka aiheutuu saman elektrodin käyttämisestä näissä kahdessa tarkoituksessa. Jotta sarjaresistanssikompensaatio toimisi toivotulla tavalla, täytyy mikropipetin vastuksen olla kohtuullisen matala verrattuna solun impedanssiin. Tässä tarkoituksessa pyritäänkin rikkomaan solukalvo siten, että mikropipetillä on matalaresistanssinen pääsy koko soluun. Tästä menetelmän nimi kokosolu-patch-clamp (Sherman-Gold 1993).



**Kuva 2.7. Solu kokosolu jännitelukitusmittauksessa. Kuvassa nähdään patch-elektrodi ja vahvistin. Pipetin sisällä oleva liuos perfusoi solun sisään. Koska patch-clamp-vahvistimen piiri ylläpitää samaa jännitettä kahdessa sisääntulossa, potentiaali  $V_c$  lisätään soluun. Vahvistimen ulostulo on verrannollinen solukalvon virtaan,  $I_{out}$  (Jackson 1997).**

Pipetin kärjessä mitattu jännite on kokeentekijän kontrolloiman kalvopotentiaalın  $V_m$  ja virran indusoiman jännitehäviön summa pipetin yli. Pipetin sarjaresistanssin ja rikkoutuneen kalvon jäänneresistanssin läpi kulkeva virta on usein riittävän suuri aiheuttamaan merkittäviä jännitevirheitä. Näiden virheiden kompensointiin on olemassa erilaisia tekniikoita. Virheiden suuruuden arvioimiseksi kuvitellaan tilanne, jossa sarjaresistanssikompensaation maksimi on 80 %. Tämän arvon ylittäessään systeemi oskilloi ja solu tuhoutuu. Oletetaan lisäksi, että pääsyresistanssi (access resistance; pipetin resistanssin ja rikutun solukalvon resistanssin summa)  $R_a$  on 5 M $\Omega$ . Kompensaation jälkeen

vastuksen efektiivinen arvo  $R_{a, \text{eff}}$  on vain 1 M $\Omega$ . Tässä tapauksessa siis 10 nA virta aiheuttaisi 50 mV suuruisen kompensoimattoman jännitevirheen, joka saataisiin vähennettyä 10 mV:iin kompensoinnin avulla. Tällä tekniikalla ei selvästikään voida mitata suuria virtoja. Pienimpiäkin virtoja mitattaessa on tärkeätä kiinnittää huomiota sarjaresistanssin kompensoitioon ja ottaa huomioon myös tästä toimenpiteestä huolimatta jäljelle jäävä jännitevirhe. Myös kokosolu-patch-clampin ajalliseen resoluutioon vaikuttaa  $R_{a, \text{eff}}$  ja siten sillä on vaikutuksensa myös kalvon kapasitanssiin ( $\tau = R_{a, \text{eff}}C_m$ ). Täten tekniikkaa rajoittaa myös siinä mielessä pieniin soluihin, että aikavakion tulee olla tavoitellun aikaresoluution rajoissa (Sherman-Gold 1993).

### 2.6.2. Perforaatio-patch-tekniikka

Perforaatio-patch-tekniikalla voidaan mitata kokosoluvirtoja, yksittäisten kanavien virtoja ja solukalvon jännitettä vähemmän invasiivisesti kuin standardeissa patch-clamp tai mikroelektrodimitauksissa (Sherman-Gold 1993). Kokosolu-patch-clamp-menetelmä saattaa johtaa solunsisäisen plasman ja mikropipetin täyttöliuoksen dialyysiin aiheuttaen täten postsynaptisen vasteen alasajon (Ye-Hong ym. 2004).

Alkuvaiheessaan tämä perforaatio-patch-clamp-menetelmä perustui elektrodiliuokseen lisätyn ATP:n käyttöön. Tämä mahdollisti solukalvon jännitteen kontrolloinnin ja pienten syöttösolujen (mast cell; sidekudoksen mm. hepariinia ja histamiinia jyväsissään sisältämä solu) solukalvojen sähkövirtojen mittauksen. Tämä vaati kuitenkin kohdesolun, jonka kalvolla oli ATP-reseptoreita, joten tekniikan varhaisessa vaiheessa mittaukseen soveltuivat ainoastaan muutamat solutyypit syöttösolujen lisäksi. Tässä vaiheessa soluyhteys (access) oli vastukseltaan suhteellisen suuri noin 100–500 M $\Omega$  (Rae & Fernandez 1991).

Nykypäivänä käytetään useimmiten amfoterisiini-B:tä tai nystatiinia sähköisen soluun pääsyn aikaansaamiseksi. Nämä polyeeniantibiootit muodostavat reikiä kolesterolia tai ergosterolia sisältäviin solukalvoihin. Kummankin perforoituvan yhdisteen muodostavat reiät ovat sellaisia, että ne päästävät lävitseen monovalentteja kationeja ja Cl<sup>-</sup>-ioneja, mutteivät multivalentteja ioneja kuten Mg<sup>2+</sup> tai Ca<sup>2+</sup>. Monovalentit kationit ovat näiden kanavien kautta yhdeksänkertaisesti läpäisevämpiä kuin Cl<sup>-</sup>-ionit. Molaarisissa

suolakonsentraatioissa mitattaessa amfoterisiinikanavien yksittäiskanavajohtavuus on kaksinkertainen nystatiinikanaviin nähden (Sherman-Gold 1993).

### 2.6.3. Tekniikoiden vertailua

Tavallisella kokosolumittauksella on muutamia keskeisiä ongelmia. Ensinnäkin solunsisäinen aines sekoittuu mittapipetin sisällä olevaan liuokseen. Tämä tunnetaan huuhtoutumisilmiönä. Siinä sytoplasman biokemikaalit, joita tarvitaan ionikanavien aktivoitumiseen, laimenevat epäaktiiviseen pitoisuuteen. Yleisiä esimerkkejä huuhtoutumisilmiön vaikutuksista ovat kalsiumkanavien toiminnan heikkeneminen sekä reseptoriaktivoituvien toisiolähettiläisten vasteiden puuttuminen hetki soluyhteyden saavuttamisen jälkeen. Toinen ongelma on normaalien solunsisäisten  $\text{Ca}^{2+}$ -puskurointimekanismien häiriintyminen. Perforaatio-patch-clamp-tekniikka kehitettiin näiden ongelmien ratkaisemiseksi. Erona kokosolumittaukseen on myös sähköisen yhteyden vahvistuminen solun sisäosan ja mittaalektrodin välillä (Korn & Marty 1991). Perforaatio-patch-clamp-tekniikan vahvuuksiin kuuluu, ettei perforoiva yhdiste itse läpäise aikaansaamiaan reikiä, eikä näin ollen diffundoidu solun sisään ja vaikuta siten solun sytoplasmiseen biokemiaan (Rae & Fernandez 1991).

Perforaatio-patch-clamp-menetelmän edut perustuvat sille yksinkertaiselle tosiasialle, että solun virtoja, jännitteitä ja kapasitanssia kyetään mittaamaan mittaalektrodin penetroimatta sytosoliin ja menetelmä on tässä mielessä ei-invasiivinen (Rae & Fernandez 1991). Kumpikin tekniikoista alkaa gigaliitoksen muodostamisella mittapipetin ja solukalvon välille. Perinteisessä kokosolumittauksessa tämä matalavastuksinen yhteys luodaan useimmiten ainakin osittain imulla ja/tai jännitepulsseilla kun taas perforaatio-patch-clamp-menetelmässä tämä saadaan aikaan aiheuttamalla solukalvoon pieniä reikiä, jotka ovat erittäin valikoivia pienille monovalenteille ioneille. Gigaliitoksen synnyttyä se on jokseenkin herkkä edellä mainituille perinteisessä kokosolumittaustekniikassa hyödynnetyille solun reiättämisen keinoille. Tässä mielessä perforaatio-patch-clamp on soluille hellävaraisempi menetelmä. Siinä aikaansaatu gigaliitos menetetään huomattavasti harvemmin kuin traditionaalisessa kokosolumittauksessa (Sherman-Gold 1993). Suurimmat sytoplasmiset molekyylit pysyvät myös solussa reikien pienen läpimitan ansiosta.

Nystatiinin käytön on esitetty parantavan huomattavasti soluyhteyden (access) vastusta. Sen avulla päästään noin 15–50 M $\Omega$  vastukseen pipetin kärjen ja solukalvon välillä. Nystatiinia voidaan myös käyttää kaikkien kolesterolia tai ergosterolia sisältävien solukalvojen penetroiintiin (Rae & Fernandez 1991). Perforaatio-patch-clamp-tekniikassa aikaansaatu verrattain matala pääsyresistanssi on myös stabiilimpi kuin standarditekniikassa saavutettu. Kokosolukompensaatio, josta tarkemmin mittaosiossa, on myös useimmissa soluissa helpompi tehdä perforaatio-patch-clamp- kuin perinteisellä kokosolumenetelmällä (Sherman-Gold 1993). Perforaatio-patch-clamp-menetelmä sallii myös traditionaalista kokosolumittausta laajemman pipetin lasimateriaalivalikoiman käytön (Rae & Fernandez 1991).

Perforaatio-patch-clamp-tekniikalla on toisaalta myös heikkoutensa perinteiseen kokosolumittaukseen verrattuna. Samanlaisissa mittaolosuhteissa sarjaresistanssi on perforaatio-patch-clampin tapauksessa kolme kertaa suurempi, mikä lisää kaikkia sarjaresistanssista riippuvaisia jännitelukitusilassa ilmeneviä virheitä. Näin ollen mittaukset rajoittuvat virtoihin, jotka eivät ole liian nopeita tai suuria. Esimerkiksi tetrodotoksiiniherkkiä Na<sup>+</sup>-virtoja voidaan vain harvoin mitata perforaatio-patch-clamp-menetelmällä (Korn & Marty 1991). Perforaatio-patch-clamp-mittauksissa sähköisen soluyhteyden aikaansaaminen kestää huomattavasti kauemmin kuin imu- ja/tai jännitepulsseilla aikaansaatu. Mikäli halutaan seuloa suuri määrä soluja jonkun solukalvon ominaisuuden tutkimiseksi, tällä saattaa olla hyvinkin suuri merkitys (Sherman-Gold 1993). Huuhtoutumisilmiön vaikutus on suurimmillaan mitattaessa pieniä soluja kokosolumittauksessa. Suurten solujen tapauksessa huuhtoutumisen vaikutukset voidaan kiertää yksinkertaisesti käyttämällä kärjen halkaisijaltaan pienempiä mittapipettejä. Niinpä suurten solujen tapauksessa perforaatio-patch-clamp-menetelmä on usein tarpeeton (Korn & Marty 1991). Se ettei pipetin sisältö diffundoidu solun sisään pieniä ioneja lukuun ottamatta, saattaa tutkimusongelmasta riippuen olla myös perforaatio-patch-clamp-menetelmän heikkous. Täten pipetin sisältämien perforoimattomien yhdisteiden vaikutusta solunsisäisiin signaalintimekanismeihin ei tällä menetelmällä voida tutkia toisin kuin traditionaalisilla menetelmillä, joilla sytosoli voidaan dialysoida ja sen sisältö voidaan korvata halutunlaisella (Sherman-Gold 1993).



Pipettiliuos ja solun sytoplasma ovat Donnanin tasapainossa. Siten pipetin tulee sisältää sytoplasmaa vastaava, solukalvoa heikosti läpäisevien anioni- ja  $\text{Cl}^-$ -konsentraatio, muutoin syntyy kloridi-ionien sisään- tai ulosvirtaus riippuen virheen suunnasta. Tämä aiheuttaa varauseroa tasapainottavan solun tilavuutta muuttavan kationi- ja vesivirran. Amfotesiini-B:n tai nystatiinin muodostamien kanavien kationipermeabiliteettia heikompi  $\text{Cl}^-$ -ionien läpäisevyys johtaa tasapainotilan hitaaseen muodostumiseen. On vaikea löytää sellaisia solukalvoja läpäisemättömiä anioneja, jotka vastaavat solun sisäisten solukalvoa läpäisemättömien anionien efektiivistä valenssia. Ulkoiset häiriötekijät vaikuttavat perforaatio-patch-clamp-tekniikassa herkästi solun volyymimuutoksiin jännitelukitustekniikassa. Tätä ongelmaa ei niinkään ole kokosolukonfiguraatiossa, jossa solutilavuus pysyy kohtuullisen vakioituna pipetin täyttönesteen suuren tilavuuden ja pipetin kärjen suuren hydraulisen johtavuuden johdosta (Sherman-Gold 1993).

### 2.7. Solujen visualisointi leike-patch-clamp-tekniikassa

Tässä luvussa esitellään leike-patch-clamp-työskentelyssä hyödynnettävä tehokas visualisoimistekniikka IR-DIC (infrared differential-interface-contrast). Lisäksi perehdytään tämän visualisoimistekniikan avulla saavutettaviin etuihin; sopivien mittaussolujen valintaan sekä gigaliitoksen syntymistä helpottavan pipetti-solu-rajapinnan muodostumisen karakterisointiin.

#### 2.7.1. IR-DIC-tekniikka

Infrapunavalon käyttäytymiseen perustuva IR-DIC-tekniikka on tehokas väline neuronien visualisointiin leikkeessä. IR-DIC-videomikroskopiitekniikan korkea erotuskyky parantaa merkittävästi leikkeen hienorakenteiden näkyvyyttä sekä neuronien identifiointia. Leikkeiden tulee tosin olla verrattain ohuita (300–400  $\mu\text{m}$ ) riittävän tarkkuuden saavuttamiseksi tällä visualisointimenetelmällä (Ye-Hong ym. 2004).

IR-DIC-videomikroskopiitekniikalla saadaan näkyviin myös solut, joiden tuma on selkeästi näkyvissä. Nämä solut ovat usein soveltumattomia ainakin pitkäkestoisiin mittauksiin kuten seuraavassa alaluvussa tarkemmin käy ilmi. IR-DIC-teknologian hyöty tulee esiin keskeisenä mittaussolun valintatilanteessa, jossa tämän teknologian ansiosta saadaan

suhteellisen helposti valittua solu, joka kestää mittaamista jopa useita tunteja sähköfysiologisten ominaisuuksien heikentymättä. Terveen solun solukalvo näyttää IR-DIC-kuvassa sileänä ja kirkkaana. Näiden solujen kalvossa ei myöskään esiinny kuplia tai painaumuksia ja ne näyttävät kolmiulotteisina. Tällaisen solujen tarkan esivalinnan tuloksena ei ole lainkaan epätavallista saada kelvollinen kokosoluvirtamittaus jopa 80–100 %:ssa mittaukseen valituista neuroneista. Tässä arvioissa ei tosin oteta huomioon kokeen epäonnistumisia, jotka johtuvat esimerkiksi elektrodin kärjessä olevasta ylimääräisestä soluväliaineksestä tai pipetin vetovaiheesta kärkeen jääneestä lasimateriaalista tai mekaanisista ongelmista kuten mikromanipulaattorin toimintahäiriöistä (Walz 2002).

Konventionaalisella mikroskoopilla visualisoitaessa solujen soomaosat ovat vain heikosti erotettavissa, puhumattakaan dendriiteistä ja pienemmistä neuroneista. Brian MacVicar esitteli vuonna 1984 ensimmäisenä infrapunavaloa (IR) ja videokameraa neuronien visualisoinnissa hyödyntäneen aivoleiketutkimuksensa. IR-filtteröidyllä valolla on merkittäviä etuja verrattuna aiemmissä tutkimuksissa hyödynnettyyn näkyvän spektrin aallonpituuden valoon. IR-valon pidempi aallonpituus mahdollistaa valon penetroitumisen syvemmälle kudoksettyyn näkyvää valoa vähäisemmällä sironnalla (Walz 2002).

IR-valon ja videokameran yhdistelmätekniikka on tehnyt mahdolliseksi paksumpienkin leikkeiden visualisoinnin ja mittaukseen valittavien solujen entistä tarkemman esiselonnan. Ennen IR-DIC-teknologiaa jouduttiin käyttämään vieläkin ohuempia leikkeitä ( $\leq 150 \mu\text{m}$ ), jotta kyettiin näkemään riittävän hyvin leikkeiden sisällä sijaitsevat neuronit. IR-DIC-videomikroskooppimenetelmän ansiosta voidaan visualisoida hyvinkin tarkasti myös syvempiä aivo- ja selkäydinleikkeiden rakenteita. Paremman neuronien yhteyksien säilymisen ja täten todellista fysiologista tilannetta vastaavan tilanteen säilyttämiseksi onkin järkevää käyttää 400–500  $\mu\text{m}$  paksuisia leikkeitä (Walz 2002).

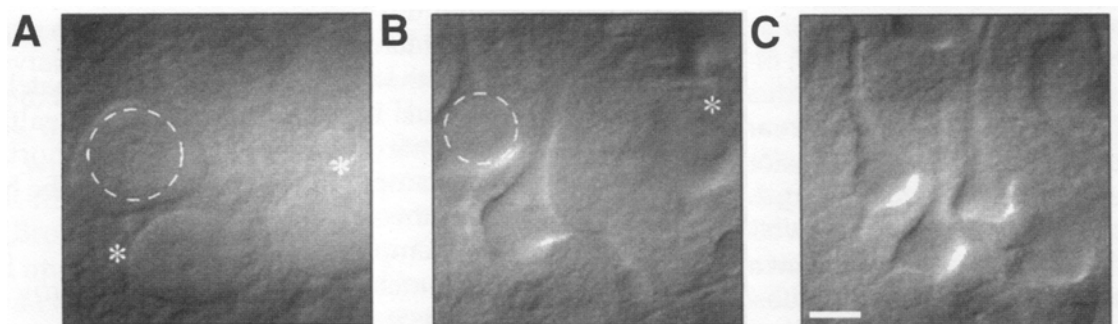
Tällekin visualisointitekniikalle on tosin aivan viime aikoina kehitetty vielä hienostuneempi vaihtoehto. Eräissä aivan tuoreissa tutkimuksissa selvitettiin, voivatko eri segmentaalista takajuurista peräisin olevat C- ja A $\delta$  -afferentit konvergoida monosynaptisesti yksittäiseen substantia gelatinosaan (SG, lamina II) neuroniiin. Tässä

tarkoituksessa tutkimuksessa visualisoitiin SG:n neuronit rotan selkäydinpreparaatissa kokolannelaajentuman alueelta, johon on kiinnittyneenä kaikki kuusi segmentaalista takajuurta. Näiden yksittäisten neuronien visualisoiminen ilman väriainetta oli mahdollista tutkimuksessa hyödynnetyn uuden LED-pohjaisen kuvantamistekniikan ansiosta. Tutkimuksen tärkeimpänä tuloksena selvisi, että kolmasosa SG:n neuroneista vastaanottaa monosynaptista syöttöä kahdesta neljään eri segmentaalisesta takajuuresta. Näin ollen tutkimuksessa päädyttiin ehdottamaan uutta primäärien afferenttien mallia, jonka mukaan jotkut C- ja A $\delta$  -säikeet, jotka hermottavat yhtä kutaanista (ihoon liittyvää) aluetta (periferaalinen konvergensi) ja nousevat yhteistä periferaalista hermoa pitkin, saattavat hajaantua selkäydinhermojen tasolla ja tulla selkäyttimeen eri segmentaalisten takajuurien kautta, mutta lopulta kuitenkin uudelleen konvergoida monosynaptisesti yksittäiseen SG-neuroniin. Tämä organisaatio saattaa olla keskeinen tarkkojen ja karkeiden neuraalisten kehon pintaa edustavien karttojen muotoutumisessa selkäytimen tasolla. Diplomityössä pystytetyn laitteiston kehittämisen näkökulmasta erityisen kiinnostavan tutkimuksesta tekee siinä käytetty visualisoimistekniikka, joka saattaisi olla mahdollinen kehitysaskel tulevaisuudessa diplomityössä pystytetyn laitteiston edelleenkehityksessä. Infrapuna-LED-kuvantamistekniikka mahdollisti Pinton ja kumppanien tutkimuksen tapauksessa mustavalkoiseen CCD-kameraan (charge-coupled device camera) verrattuna vaaditun valotusajan lyhenemisen 5–30 ms ja paransi näin kuvantamisnopeutta (Pinto ym. 2008).

### 2.7.2. Visualisoinnin tärkeimmät edut

Sopivan solun valinta on välttämätön edellytys onnistunutta patch-rekisteröintiä silmällä pitäen. Jokaisessa leikkeessä on sekä terveitä, että kuolleita ja eri tavoin vaurioituneita neuroneja. Huonokuntoinen solu on joko täysin soveltumaton patch-mittaukseen tai sitten se kuolee hyvin pian mittauksen aloittamisen jälkeen. Lähimpänä leikkeen pintaa olevat solukerrokset koostuvat poikkeuksetta kuolleista soluista; vähintäänkin 25  $\mu$ m leikkeen pinnasta alaspäin on kuollutta solumassaa. Kuolleille soluille on tunnusomaista turvonnut ulkomuoto ja usein myös suuri näkyvä tuma sekä selkeästi erottuva tumajyvänen. Kuvassa 2.8. on kaksi esimerkkiä tällaisista kuolleista pyöreistä soluista, jotka eivät ole patch-mittaukseen soveltuvia. Tällaiset solut usein räjähtävät lähestyvän mittaalektrodin positiivisen paineen vaikutuksesta (Walz 2002).

Ennen tehokkaita solujen visualisoimistekniikoita leikkeiden terveys määritettiin ainoastaan lepokalvojäännitteen arvon ja aktiopotentiaalien koon kaltaisten parametrien avulla. Visualisoinnilla saadaan siis aikaan merkittävä parannus kokeenkestoon, kun mittaukseen soveltuvat solut voidaan melko suurella varmuudella poimia huonovointisten ja kuolleiden joukosta jo ennen kuin niihin edes yritetään saada gigaliitosta (Ogden 1994).



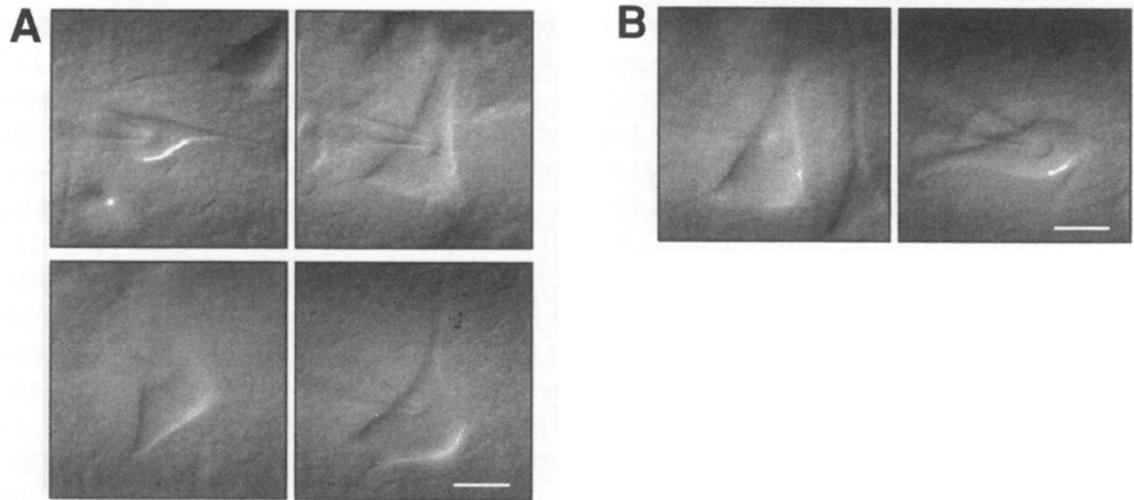
**Kuva 2.8.** IR-DIC-videomikrografeja visuaalisesti terveistä ja epäterveistä neuroneista 400  $\mu\text{m}$  paksuisessa aivoleikkeessä. A-kuvassa näkyy esimerkkejä kuolleista soluista peririnaalikorteksin kerroksesta V. Tässä ainoat näkyvät rakenteet ovat pyöreä sooma ja erottuva tuma – oletettavasti johtuen somaattisen kalvon rikkoutumisesta. Yhdessä kuvan A soluista tuma on merkitty kuvaan katkoviivalla rajatulla ympyrällä ja muut tähdellä. Kuvassa B on muutamia epäterveitä neuroneita samalta alueelta kuin kuvassa A. Näissä soluissa tuma on selvästi näkyvissä somaattisen kalvon läpi. Ilman IR-DIC-videoteknologiaa nämä solut eivät olisi erotettavissa terveistä patch-clamp-mittaukseen soveltuvista neuroneista. Itse asiassa useimmat kuvan B-tyyppiset solut voidaan valita patch-clamp-mittaukseen, mutta ne eivät useimmiten kestä kuin 5–30 minuuttia, vaan kuolevat verrattain nopeasti. Kuvassa C on esimerkkejä terveistä patch-mittauksen kannalta optimaalisista pyramidaalisoluista samaisesta solukerroksesta kuin aiempien kuvien solut. Solut muistuttavat kovasti kuvan B soluja, mutta näissä soluissa tuma ei ole näkyvissä. Ainoastaan tällaisilla soluilla on mahdollista suorittaa stabiileja pitkäkestoisia kokosolumittauksia, jotka ovat kestoltaan esimerkiksi 1–5 tuntia. Kuvassa C esitetty kuvia A–C koskeva skaalapalkki on pituudeltaan 10  $\mu\text{m}$  (Walz 2002).

Myös kutistuneet tai kaksiulotteiset neuronit ovat mittaukseen soveltumattomia, vaikkakin eroavat edellä kuvatuista siinä, että niiden dendriittirakenne on edelleen nähtävissä. Kaksiulotteiset solut ovat tunnistettavissa siten, että niiden syvyysvaikutelma puuttuu siirryttäessä fokustasossa ylös- ja alaspäin. Kutistuneisiin tai kaksiulotteisiin soluihin voidaan kyllä useimmissa tapauksissa saada aikaan gigaohmien suuruusluokkaa oleva

liitos, mutta kokosoluvirtamittauksen tekeminen on kuitenkin näissä soluissa todella vaikeaa, vaikka lisättäisiin suurikin imu (Walz 2002).

Lähestyttäessä valittua solua pipettiä viedään varovasti yhä lähemmäs, kunnes positiivinen niin kutsuttu takapaine saa aikaan pienen kuopan (dimple) solukalvon pintaan. Oikeankokoinen kuoppa on visualisoitu kuvassa 2.9. Oikeankokoisen kuopan ilmestyessä positiivinen paine nopeasti poistetaan ja hyvin hento imu lisätään gigaliitoksen aikaansaamiseksi. Mikäli positiivista painetta ei poisteta ajoissa, se aikaansaa hyvin suuren kuopan solukalvon pintaan, joka saattaa vahingoittaa solukalvoa. Takapaine lisätään alun perin siksi, että pipetin kärki pysyisi puhtaana nesteessä ja leikkeessä liikuttaessa (Walz 2002).

Sokkometelmällä (blind method) voidaan mitata miniatyyrisiä postsynaptisia virtoja ja lisätä mitta-asetelmaan erilaisia lääkkeitä tai proteiineja, jotka saavuttavat sytoplasman elektrodin täyttöliuoksen ja solunsisäisen plasman liuosvaihtuvuuden ansiosta. Sokkometelmällä ei kuitenkaan voida suoraan havainnoida mittaukseen valitun solun kuntoa. Usein tässä menetelmässä epäonnistutaankin säilyttämään laadukkaan patch-clamp-mittauksen vaatima mittauskonfiguraatio johtuen mittaukseen valitun solun heikosta kunnosta. Sokkometodia on kuitenkin mahdollista soveltaa menestyksekkäästi sellaisilla leikkeen alueilla, joissa neuronien tiheys on suuri. Tällainen alue on juuri pinnanpuoleinen lamina II eli SG-alue selkäytimen takajuuressa. Sen sijaan syvemmissä takajuuren alueissa (lamina III-V) sokkometelmä on erittäin tehoton neuronien harvan esiintymistiheyden takia (Ye-Hong ym. 2004).



**Kuva 2.9.** Tässä kuvassa nähdään esimerkkejä kuopista (dimple), jotka on saatu solukalvon pintaan aikaiseksi kokosolu-patch-pipetin positiivisella paineella. A-kuvasarjassa on IR-DIC-videomikrograafeja, jotka esittävät tyypillisiä sopivia kuopan kokoja. B-kuvissa näkyvät kuopat ovat liian suuria. Visuaalisesti terveiksi havaituissa soluissa liian suuri kuoppa seuraa joko liian suuresta positiivisesta paineesta pipetissä tai epäonnistuneesta paineen päästämisestä. Paine tulisi päästää välittömästi kuopan tultua näkyviin. B-kuvaparissa stabiilin kokosolumittauksen suorittaminen on epätodennäköistä. Kuvissa esiintyvä skaalapalkki on pituudeltaan 10  $\mu\text{m}$  (Walz 2002).

Esimerkiksi Yoshimuran ja kumppanien tutkimuksessa vuodelta 1993 käytettiin sokkomenetelmää SG:n neuronien kokosolu-patch-clamp-mittauksissa. Heillä todennäköisyys saada aikaan gigaliitos oli sokkomenetelmän soveltamisesta huolimatta korkea. Yli 70 % yrityksistä he onnistuivat aikaansaamaan 2–10 G $\Omega$  vastuksisen gigaliitoksen. Kuitenkin todennäköisyys saada aikaan kokosolu-patch-clamp-rekisteröinti jäi 20 % tasolle. Tämä johtui oletettavasti siitä, että gigaliitos saattoi sokkomenetelmässä muodostua yhtä lailla esimerkiksi membraanin pirstaleen kuin terveeseen elävän solun membraanin ja pipetin välille (Yoshimura ym. 1993). Niinpä, vaikka sokkomenetelmä onkin mahdollinen tutkimuksemme kohdealueella selkäytimen takajuuren SG:ssa, ovat visualisoimisen edut kiistattomat niin mittasolujen valinnassa, mittauksen vaatiman sähköisen yhteyden aikaansaamisessa kuin mittauksen ylläpitämisessä.

## 2.8. Patch-pipetit ja liuokset

Tässä luvussa tarkastellaan kokosolu-patch-clamp-mittauksessa käytettävien pipettien lasimateriaalin valintaan sekä pipettien valmistamiseen ja käyttöön liittyviä seikkoja yleisellä tasolla. Tämän jälkeen esitellään periaatteita pipettiliuoksen eli intrasellulaariliuoksen, solunulkoisen liuoksen eli ekstrasellulaariliuoksen sekä leikeliuoksen koostumuksen suunnitteluun. Luvun lopussa esitellään mittauksien kannalta olennaisia pipetin RC-ominaisuuksia.

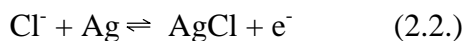
Lasipipetin ja solukalvon välisen gigaliitoksen erittäin suuri vastus viittaa siihen, että näiden välillä vallitsee hydrofobisia kemiallisia vuorovaikutuksia. Lasimateriaalin kemiallinen koostumus saattaa näin ollen vaikuttaa liitosten syntymisen todennäköisyyteen (Ogden 1994). Tosin Rae ja Levis esittävät, ettei voida tehdä yksiselitteisiä ja pitäviä johtopäätöksiä erityyppisten lasien liitoksente kosoveltuvuudesta (Rae & Fernandez 1991).

Muita huomioonotettavia seikkoja lasimateriaalin valinnassa ja työstämisessä ovat muun muassa pipetinkärjen halkaisija ja muoto sekä taustamelun vähentämisen tarpeen aste. Tavoitepipettien kärjen koko ja muoto vaikuttaa kokosolukonfiguraatiossa sarjaresistanssiin (Ogden 1994).

Pipetin rooli patch-clamp-mittauksessa ei pelkisty ainoastaan gigaliitosten muodostamiseen. Pipetti toimii myös nestesiltana, joka yhdistää virralle herkän vahvistimen solun pintaan (Walz 2002). Patch-mikropipetti koostuu AgCl-päällystetystä Ag-metallilangasta, joka on sijoitettu liuksella täytettyyn lasimikropipettiin. Pipetin sisällä oleva elektrolyyttiliuos tarjoaa nesteyhteyden solusta elektrodiin. Niinpä vetolaitteella valmistetut lasielektrodit eivät ole itsessään elektrodeja, vaan geometrialtaan sopivia kanavia, joiden kautta tämä sähköinen nesteyhteys luodaan. Tästä syystä mikroelektrodeja usein kutsutaan pipeteiksi tai mikropipeteiksi (Sherman-Gold 1993).

Elektrodit konvertoivat liuoksen ionivirrat metallilangan elektronivirraksi. Ne on valmistettu materiaalista, joka voi osallistua liuoksen sisältämän tietyn ionityypin kanssa palautuvaan reaktioon. Elektrofysiologiassa yleisimmin käytetty elektrodimateriaali on

hopea, joka päällystetään, niin sanotusti kloridoidaan, hopeakloridilla. Tällä elektrodilla kloridi-ionien liuoksessa kantama virta konvertoidaan elektroneiksi seuraavalla reaktiolla, joka on kuvattu alla kaavassa 2.2. (Sherman-Gold 1993)



Erilaiset preparaattit ja koetyypit vaativat erilaisia lasipipettejä. Lasipipettien sähköiset ominaisuudet riippuvat kärjen geometriasta ja valitun lasimateriaalin johtavuudesta. Kokosolumittauksessa vaadittu matalavastuksinen pipetin kärki edellyttää, että pipetin kärjen kaventuminen tapahtuu jyrkässä kulmassa ja sisähalkaisija on suhteellisen suuri. Sisähalkaisijan tulee olla niin suuri kuin on mahdollista sillä edellytyksellä, että tiukan liitoksen muodostaminen on edelleen mahdollista.

Tarkoituksenmukaisen lasielektroodin valmistamisessa on useita vaiheita. Ensin tulee valita sopiva lasimateriaali. Kokosolumittauksessa keskeistä on saada aikaan niin tylppä ja matalavastuksinen elektrodi, että se on tarkoituksenmukainen muodostamaan gigaliitoksen solukalvon kanssa (Walz 2002). Kokosolumittapipetin kannalta matala häiriötaso ei ole niin keskeinen kuin yksittäissolumittaukseen tarkoitettun pipetin. Kokosolumittauksessa taustahäiriö on elektrodiresistanssin dominoima (itse asiassa access resistanssin), joka on sarjassa koko solun kapasitanssin kanssa. Näin ollen kokosolutilanteessa, toisin kuin yksittäissolumittauksessa, pipetin vaikutus mittauksen taustahäiriöön ei ole niin tärkeää (Walz 2002). Jotta mittaukseen aikaansaataisiin kokosoluvirtamittaukselle sopiva kaistanleveys ja saataisiin rajoitettua virheitä asetetussa jännitteessä, pipetin vastus ei saisi ylittää muutamaa megaohmia. Useimmat patch-clamp-pipetit valmistetaan borosilikaatti lasista, kuten myös standardit mikroelektrodit (Ogden 1994). Ne pehmenevät vasta suhteellisen korkeissa 700–850 C°:een lämpötiloissa (Sherman-Gold 1993). Kokosolumittauksessa käytetyt pipetit voivat olla ohutseinäisiä, toisin kuin yksittäiskanavamittauksessa käytetyt. Kokosolumittauksessa pipetin seinän paksuudesta riippuvaiset häiriöt ovat toissijaisia muihin häiriölähteisiin verraten. Liian kapea seinämä on kuitenkin pahasta, sillä tällöin pipetin kärki saattaa helpommin penetroida solun sisään liitoksen tekovaiheessa. Sopiva pipetin OD/ID-suhde eli ulkohalkaisijan ja sisähalkaisijan



suhde kokosolumittapipetille on 1,2–1,4 (Walz 2002). Matalavastuksisia pipettejä (pipetin kärjen läpimitta 1–3  $\mu\text{m}$ ; vastus noin 1–5  $\text{M}\Omega$ ) saadaan helpoimmin vedettyä ohuesta lasista (Ogden 1994).

Pipettien veto tapahtuu siten, että kapillaarin keskiosaa lämmitetään samalla kun päitä vedetään erilleen toisistaan. Lämmitys ja veto tapahtuvat sykleissä, joiden lukumäärää ja parametreja voidaan vaihdella tavoitteena olevien pipetin ominaisuuksien mukaan. Tässä vaiheessa metodologiset yksityiskohdat riippuvat käytetystä vetolaitteesta.

In-vitro leikepreparaattitutkimuksen arvo perustuu osaltaan mahdollisuuden säätää systemaattisesti ja kontrolloidusti tutkimussolujen solunulkoisen nesteen ja jopa solunsisäisen nesteen koostumusta (Walz 2002). Pipettiliuoksissa (intrasellulaariliuos) käytetään hyvin laajaa valikoimaa erilaisia liuoksia riippuen koeasetelmasta. Kokosolumittauksessa tehtäessä on keskeistä kiinnittää huomiota siihen, että pipetin sisältö diffundoituu perusteellisesti soluun ja laimentaa näin ollen kaikkien normaaliin neuronin sisällä olevien yhdisteiden pitoisuudet. Näin ollen on tärkeää valita sellainen pipettiliuos, joka ei peruuttamattomasti muuta mitattavan ilmiön kannalta oleellista neuronaalista toimintaa tai aiheuta mitattavien virtojen heikkenemistä. Solunulkoista liuosta käytetään preparaattileikkeen jatkuvaan perfuusioon kokeen aikana sekä leikkeiden inkubaatioon leikkeiden teon jälkeen (Walz 2002, Ogden 1994).

Sekä solunulkoisen että solunsisäisen liuoksen koostumuksen suunnittelussa tulee ottaa huomioon gigaliitoksen tekemisen helppous, preparaatin säilyminen hyvässä kunnossa sekä tutkimuskohtaiset spesifiset lähtökohdat. Kokosolumittauksessa solunulkoisen sekä pipetintäyttöliuoksen koostumukset näyttelevät erittäin kriittistä roolia. Koska hyvinkin pieni määrä roskaa pipetin kärjessä saattaa estää gigaliitoksen muodostamisen, tulee pipetintäyttöliuos aina steriilifiltroida ennen pipetin täyttämistä (Ogden 1994).

Patch-clamp-pipettiliuoksen valinnassa keskeistä on matkia solunsisäistä nesteympäristöä. Niinpä avainasemassa on  $\text{Ca}^{2+}$ -ionien konsentraatio. Vapaan kalsiumin konsentraatio solun sisällä tiedetään alhaiseksi, mutta kuitenkin ei ole yhtä sääntöä, kuinka  $\text{Ca}^{2+}$ -ionien

konsentraatio tulisi pipetintäyttöliuoksessa säätää. Etyleeniglykolitetraetikkahappo (EGTA) on yleisimmin käytetty kalsiumin puskuri. Yleisimmin lisätään 10 mM EGTA:a 1mM CaCl<sub>2</sub> kohti, jolloin vapaa Ca<sup>2+</sup>-ionikonsentraatio on noin 25 nM 7,2 pH:ssa. Vapaan kalsiumin määrä liuoksessa riippuu tosin muistakin tekijöistä ja on herkkä EGTA:n puhtaudelle. Mikäli halutaan suorittaa mittaus matalalla intrasellulaariliuoksen EGTA-pitoisuudella, on gigaliitoksia hyvin paljon vaikeampi saada aikaan ja mittaukset ovat huomattavasti epästabiilimpia. BAPTA on toinen yleisesti käytetty kelaattori. Se sitoo Ca<sup>2+</sup>-ioneja huomattavasti nopeammin kuin EGTA. Tätä käytetäänkin, kun halutaan saada aikaan erityisen tiukka solunsisäisen kalsiumin kontrolli (Ogden 1994). Eräiden tutkijoiden mukaan BAPTA on kuitenkin epästabiili ja aiheuttaa R<sub>s</sub>:n kasvun (Bean 1992). Yleisesti ottaen on mahdotonta tehdä kokosolu-patch-clamp-mittauksia sellaisella intrasellulaariliuoksella, johon on lisätty Ca<sup>2+</sup>-ioneja, muttei lainkaan kelaattoria (Ogden 1994).

Koska K<sup>+</sup>-ioni on pääasiallinen sytoplasman kationi, tulee pipettiliuoksen sisältää K<sup>+</sup>-suoloja, ellei ole jotain erityisen hyvää syytä jättää sitä pois. Sytoplasman Cl<sup>-</sup>-konsentraatio vaihtelee riippuen solutyypistä, ja se on yleensä välillä 5–40 mM. Vaikka Cl<sup>-</sup>-ioneja usein käytetään pipetintäyttöliuoksissa, fysiologisempaa on korvata se orgaanisella anionilla kuten esimerkiksi glukonaatilla, aspartaatilla tai sitraatilla. Useimmissa koetyypeissä patch-clamp-mittapipetin täyttöliuoksen pH säädetään välille 7,1–7,3 ja se puskuroidaan HEPES:llä pysymään tässä arvossa. Monien kanavien aktiivisuus riippuu 1–10 mM ATP:n lisäämisestä. Tässä tarkoituksessa käytetäänkin intrasellulaariliuoksissa Mg<sup>2+</sup>-suoloja. Lisättäessä erilaisia mahdollisesti eksoottisiakin aineita solunsisäisiin liuoksiin kanavien toiminnan säätämiseksi, esimerkiksi proteiinien tai muiden signaalintimolekyylien avulla, tulee ottaa huomioon aika, jonka pipetintäyttöliuoksen ja solunsisäisen aineksen väliseen diffuusion kuluu (Ogden 1994). Tähän vaihdokseen kuluva aika on karkeasti ottaen eksponentiaalinen aikavakiolla  $\tau$  (sekunneissa). Tätä voidaan approksimoida yhtälöllä 2.3.

$$\tau = (0.60 \pm 0.17) \cdot R_a \cdot M^{1/3} \quad (2.3.)$$

Tässä yhtälössä  $\tau$  on aikavakio sekunneissa,  $R_a$  on  $M\Omega$ , ja molekyylipaino  $M$  on ilmoitettu daltonneissa. Tulee kuitenkin pitää mielessä, että nämä aikavakiot täytyy muokata sopiviksi, mikäli solun koko tai geometria poikkeaa standardina pidetystä kromaffiinisolusta. Näiden solujen kapasitanssi on  $C_0 = 5,91$  pF ja keskimääräinen säde  $r_0 = 7,68$   $\mu\text{m}$ . Tässä oletetaan siis pallomainen geometria, jolloin solun keskimääräinen tilavuus on noin  $1897$   $(\mu\text{m})^3$ . Standardista poikkeavankokoisille soluille saadaan skaalattua aikavakio verrannolla 2.4.

$$\frac{\tau}{\tau_0} = \frac{V}{V_0} \quad (2.4.)$$

Tässä  $\tau_0$  on laskettu yllä esitellyn aikavakion yhtälön avulla. Pallonmuotoisille soluille diffuusion aikavakio saadaan skaalattua joko solun säteen tai sen kapasitanssin avulla verrannoilla 2.5. ja 2.6.

$$\frac{\tau}{\tau_0} = \left( \frac{r}{r_0} \right)^3 \quad (2.5.)$$

$$\frac{\tau}{\tau_0} = \left( \frac{C_M}{C_0} \right)^{1.5} \quad (2.6.)$$

Esitetyt yhtälöt ovat empiirisesti kehitettyjä ja pohjautuvat siten rajalliseen määrään substansseja, kuten proteiineihin, dekstraaneihin, nukleotideihin, indikaattoriväriaineisiin ja pieniin ioneihin (Pusch & Neher 1988).

Solunulkoisen keinotekoisen selkäydinnesteen koostumus riippuu hyvin pitkälti käytetystä preparaattista. Yleispätevää on, että glukoosikonsentraatio säädetään tasolle, joka on korkeampi kuin fysiologisessa ympäristössä. Normaalisti glukoosin pitoisuus liuoksissa on 10–26 mM, kun se fysiologisissa olosuhteissa aivoissa on 4 mM (Walz 2002).

George Aghajanianin ryhmä osoitti vuonna 1989 tutkiessaan kasvohermotumakkeen motoneuroneita aikuisten rottien aivoleikkeissä, että leikkeitä tehtäessä on hyödyllistä

korvata leikeliuoksen NaCl samalla konsentraatiolla sakkaroosia. Tällaista leikeliuosta käyttämällä he onnistuivat saamaan kyseisessä preparaattissa stabiileja ja korkealaatuisia solunsisäisiä rekisteröintejä, joiden toteuttaminen ennen tätä leikeliuoksen koostumuksen vaihdosta ei ollut onnistunut (Aghajanian & Rasmussen 1989). Tällä uskottiin olevan vaikutusta passiivisen kloridi-ionien sisäänvirtauksen neurotoksisten vaikutusten vähentäjänä. Näitä vaikutuksia olivat solujen turpoaminen ja hajoaminen leikattaessa preparaattia. NaCl korvaaminen iso-osmolaarisella sakkaroosikonsentraatiolla palvelee kahta tarkoitusta. Ensinnäkin se vähentää natriumin sisäänvirtausta, jota tapahtuu neuronien ollessa taipuvaisia depolarisoitumaan leikkeidentekotilanteen hapenpuutteen takia. Hetkittäistä hapenpuutetta on mahdotonta välttää dissekointi-, preparaattinkäsittely- ja leikkaustilanteissa. Toiseksi se minimoi jo edellä mainitun solujen turpoamisvaikutuksen, joka alkaa passiivisella kloridisisäänvirtauksella ja jatkuu kationien ja veden sisääntulolla (Walz 2002).

#### 2.8.1. Pipettien RC-ominaisuudet

Solukalvon lisäksi myös mittalaitteiston eri osilla on tutkimuksen kannalta merkittäviä sähköisiä ominaisuuksia. Mitattaessa solun sähköfysiologisia tapahtumia, korostuvat erityisesti mittapipetin kärjen ominaisuudet. Myös pipettiä voidaan tarkastella kondensaattorien ja vastusten muodostamana rakenteena, jossa pipetin ohuen kärjen korkea resistanssi ja sen jälkeiset pipetin seinämän ja pipetin sisä- ja ulkopuolisten nesterajapintojen muodostamat kapasitanssit voivat vääristää mittatuloksia. Vastuskondensaattori-kytkennöissä voidaan puhua niin kutsutuista RC-alipäästösuodatuksesta ja RC-ylipäästösuodatuksesta. Mitattaessa RC-sarjaankytkennässä (vaihto)jännitelähteen signaaleita kondensaattorin yli, havaitaan nopeat muutokset kondensaattorin aikavakiosta riippuen vaimentuneina, mikäli kondensaattori ei ehdi täysin latautua lyhyen signaalijännitepiikin aikana kokonaan, vaan signaalin loppuessa alkaa jo purkautua. Jännitehäviöt kondensaattorissa pienenevät puolestaan signaalitaajuuden kasvaessa, jolloin yhä suurempi osa jännitehäviöistä tapahtuu vastuksessa – molemmat ilmiöt vaikuttavat olennaisesti mittaustuloksiin mitattaessa solufysiologiassa ominaisia nopeita jännitemuutoksia. Pipetin dimensiot vaikuttavat osaltaan pipetin kapasitanssiin; eristekerroksen paksuuden kasvaessa kapasitanssi pienenee. Pipetin

kondensaattoriominaisuudet riippuvat myös pipetin syvyydestä nesteliuoksessa. Mitä suuremman ulkopinta-alan neste kostuttaa, sitä suuremmaksi muuttuu pipetin seinämän kapasitanssi. Samoin kasvaa RC-aikavakio, joten mitattavan signaalin alipäästösuodattuminen lisääntyy (Voipio 2004). Mitta-asetelmassa vaikuttaa myös neste-ilma-rajapinta. Mikäli neste kostuttaa pintajännityksen vaikutuksesta vain ohuena kerroksena pipetin pintaa, voidaan ohut nestepinta mieltää pipetin kapasitanssin kanssa sarjaan kytkettynä vastuksena (Walz 2002).

### **3. Kokeellinen osuus**

#### 3.1. Laitteisto

Tässä luvussa kerrotaan työssä pystytetyn leike-patch-clamp-laitteiston kokoamiseen, ominaisuuksiin ja toiminnan optimointiin liittyvistä seikoista. Sähköfysiologisen laitteiston pystyttäminen esitetään ongelmalähtöisesti, niistä vaatimuksista käsin, joita mittaustalaitteistolle on asetettu.

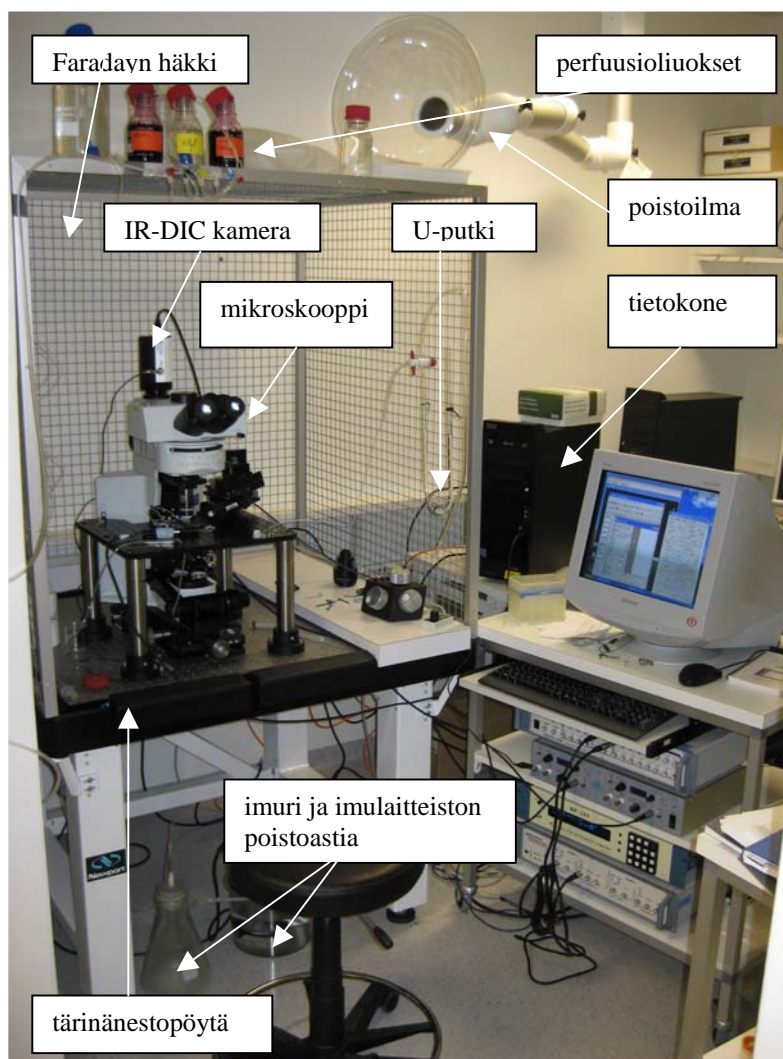
##### 3.1.1. Lähtökohtia laitteiston pystyttämiseksi

Leikepatch-clamp-tekniikan ylivertaisuuden perustana on mahdollisuus hyödyntää patch-clamp-mittausmenetelmiä verrattain intaktiin hermostoon. Kokosolu-mittauskonfiguraatiota käyttämällä neuronien resistanssi ja kapasitanssi ovat luokkaa, joka mahdollista muutaman pA suuruisten virtojen mittaamisen ja sallii mittausten 1 kHz suuruisen kaistanleveyden. Elektroodin vastus eli sarjaresistanssi kokosolumittauksen tapauksessa sekä kapasitanssi ovat avainasemassa mittauksen kaistanleveyden määrittämisessä (Ogden 1994).

Laitteiston huolellinen pystyttäminen ja jo tässä vaiheessa sen eri osien toimintaperiaatteisiin ja hallintaan perehtyminen on keskeistä varsinaisten mittausten menestyksekkään läpiviennin kannalta. Esimerkiksi mikromanipulaattorin ja mikroskoopin säätöjen dynaaminen ja sujuva yhteishallinta on koetilanteessa onnistumisen välttämätön edellytys.

Sähköfysiologisen laitteiston osat; laitteet, elektroniikka ja analyysiohjelmisto voidaan hankkia usealta eri valmistajalta ja koota yhteen monella sovelluksesta ja resursseista riippuvalla tavalla. Tässä luvussa esitellään erityisesti vaativaa leike-patch-clamp-sovellusta silmällä pitäen suunniteltu ja pystytetty laitteisto. Sähköfysiologisella laitteistolla on neljä päävaatimusta: (1) ympäristö eli keinot, joilla preparaatin pidetään hengissä ja terveenä, (2) optiikka, eli keinot preparaatin visualisoimiseen, (3) mekaniikka eli keinot, joilla saadaan mahdollisimman tarkasti mittaalektrodi kohdennettua näytteessä ja (4) elektroniikka eli keinot, joilla signaali vahvistetaan ja nauhoitetaan (Finkel & Bookman 2001). Laitteiston rakenne ja pystyttäminen käydään läpi tämän jaon pohjalta ja tässä järjestyksessä. Tietokoneohjelmien rooli laitteistossa on erittäin keskeinen sekä perusvaatimusten kaksi

että neljä täyttämässä. Kuvassa 3.1. näkyvät laitteiston pääosat. Ne laitteiston osat, jotka on sijoitettu tietokoneen näytön alle päällekkäin, ovat ylhäältä alas lueteltuina analogi-digitaalimuunnin, lämmittimen keskusyksikkö, mikromanipulaattorin ohjausyksikkö sekä vahvistin. Nämä osat näkyvät paremmin laitteiston elektroniikkaa esittelevän alaluvun yhteyteen liitettyssä kuvassa.



**Kuva 3.1. Pystytetyn leike-patch-clamp-laitteiston pääosat.**

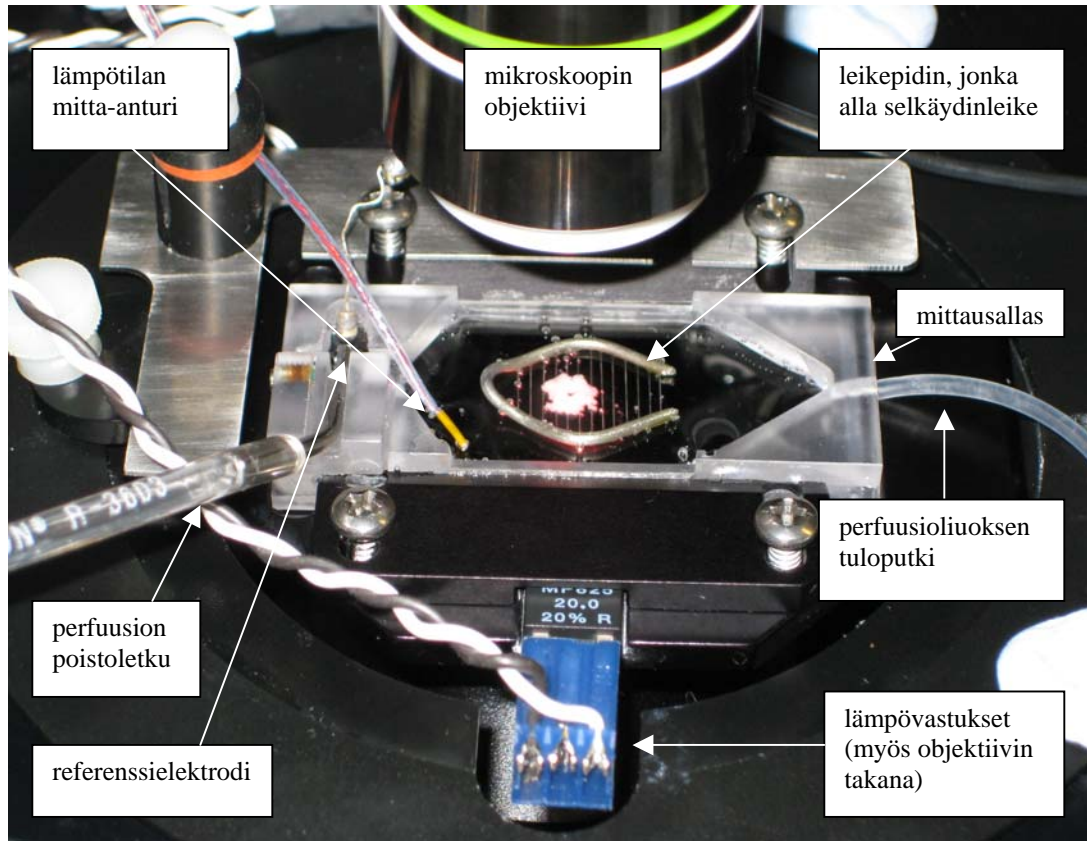
### 3.1.2. Laitteisto ja preparaatti

Leike asetetaan mittauksen ajaksi mittausaltaaseen, jonka läpi kulkee jatkuva perfuusio. Kuvassa 3.2. näkyvät mittausallas ja siihen kiinnittyvät laitteiston osat. Mittausaltaan vasemmassa laidassa näkyvä referenssielektrodi on hopeinen pellettelektrodi, joka on

kloridoitu kuten mittauselektrodikin. Jokaista mittausta ennen tulee tarkastaa elektrodien kloridipinnoitteen tasaisuus ja referenssielektrodin juotosten pitävyys. Mittausallasta ympäröivä pyöreä levy saatiin kiristettyä tiukasti paikalleen. Mittaustilanteessa näiden mittausallasta ympäröivien laitteiston osien kuten myös mikromanipulaattorin osien stabiilius on erittäin tärkeitä. Lämpövastukset kiinnitettiin mittausaltaan alustan ylä- ja alapäässä oleviin kiinnityspaikkoihin ja lämpötila-anturi asetettiin altaan pohjan reunamille niin, että se on mahdollisimman vähän tiellä, mutta kuitenkin hyvin kosketuksissa nesteeseen altaan vasemmassa päädyssä, jossa neste on kulkenut jo altaan ulkopuolella sijaitsevan esilämmittimen läpi ja on myös ehtinyt lämmentä mittausaltaassa kiinni olevien lämpövastusten vaikutuksesta. Fysiologista lämpötilaa lähentelevät koe-olosuhteet ovat huoneenlämpötilaa suotuisimmat siitä ilmeisestä syystä, että ne vastaavat paremmin elimistössä vallitsevaa tilannetta, jossa fysiologiset ilmiöt kuten diffuusio tapahtuvat nopeammin kuin huoneen lämpötilassa.

Lämpötilaa säädeltiin kaksikanavaisen lämmityslaitteen avulla. Tämän lämmityslaitteen malli on TC-344B. Lämmitysvoimakkuus säädellään laitteessa automaattisesti takaisinkytkentäluopin välityksellä. Lämmittimen kontrollipaneelin kanavalle yksi asetettiin mittausaltaan liuoksen tavoitelämpötila ja oikealla kanavalla näkyi reaaliaikainen lämpöanturin kautta mitattu todellinen lämpötila mittausaltaan liuoksessa. Aina kun lämmityslaitteen takaisinkytkentä käynnisti lämmitystoiminnon, syttyi laitteessa LED-valo merkiksi lämmitystoiminnon aktivaatiosta. Mittauksissa käytettiin kanavalla yksi 36,4 C°:een tavoitelämpötilaa, jolloin todellinen mittaustilanteen lämpötila mittausaltaan liuoksessa asettui noin 32 C° lämpötilaan. Lämpötilan säätö osoittautui suhteellisen stabiiliksi. Kunkin rekisteröinnin aikainen lämpötila merkittiin kuitenkin muistiin, lämpötilan fysiologisten ilmiöiden nopeuteen vaikuttamisen takia.





**Kuva 3.2.** Mittausallas, jossa leike paikallaan leikepitimen alla mittausaltaan pohjalla, ja siihen yhteydessä olevia laitteiston osia.

Mittausaltaan valon läpäisyn mahdollistava lasinen pohjalevy on vaihdettavissa ja näin täytyykin erittäin suurella todennäköisyydellä menetellä ainakin jossain vaiheessa syystä tai toisesta. Lasipohja on herkkä rikkoutumaan, eikä siihen tarvitse kohdistua suurtakaan painetta esimerkiksi jonkin neljästä kuvassa näkyvästä kiristysruuvista ollessa liian tiukalla, jolloin siihen saattaa syntyä murtumia. Samoin, mikäli mittausaltaan pohjassa oleviin uriin levitetty silikonieristys osoittautuu jostain kohdasta puutteelliseksi, tulee pohjalevy poistaa ja puhdistaa hyvin ja silikonieristys uusiksi. Pohjalasia vaihdettaessa tuleekin noudattaa tarkkuutta ja huolellisuutta, jotta välttyttäisiin ikäviltä viivästyksiltä koetilanteessa. Silikonieristeen annostelussa kannattaa myös olla tarkka, sillä liika eriste sotkee lasin mittausaltaan pohjan puolella ja heikentää leikkeen visualisoinnin optiikkaa. Jokaisen mittauspäivän lopuksi on hyvä puhdistaa mittausallas perfusoimalla sitä milli-Q-vedellä ja pyyhkimällä etanolilla. Myös imurin toimesta tygon-poistoletkun kautta mittauspöydän alla

olevaan imulaitteiston poistoastiaan päivän kuluessa kertynyt ekstrasellulaarineneste on hyvä tyhjentää ja astia puhdistaa päivittäin, sillä ekstrasellulaariliuos on mieluinen kasvualusta mikrobeille.

Liuokset perforoidaan mittausaltaaseen kapeaa muoviputkea pitkin gravitaation voimalla. Letku kiinnitettiin Faradayn häkin seinämään ja se kulki ruiskun läpi, johon yhdistetyn venttiilin avulla virtausnopeutta saatiin säädettyä. Perfuusioliuoksen tuloputki kulkee myös mittausaltaan etualalle sijoitetun esilämmittimen läpi. Perfuusioliuoksen tuloputken pää leikattiin ovaalin muotoiseksi ulostulo pinta-alan maksimoimiseksi. Preparaatin pitämiseksi hengissä ja terveenä tuloputken kautta tuleva liuos, jonka koostumus perustuu pitkälti tähän leikkeen solujen hengissä pysymisen funktioon, pidettiin jatkuvassa happikuplituksessa. Perfuusion toimivuutta ja tahtia pidettiin silmällä koko kokeen ajan. Mikäli altaan reunoista pääsi vähänkin nestettä yli reunojen, mikä tyypillisimmin saattoi tapahtua leikettä altaaseen asetettaessa, järkevintä oli kuivata allas huolellisesti kokonaan ja viedä leike takaisin inkubaatiokammioon siksi aikaa, kun liuoksen virtausnopeus oli säädetty uudelleen kohdilleen ja varmistettu, ettei nesteyhteyttä altaan reunojen ulkopuolelle enää ollut.

### 3.1.3. Optiikka

Visualisoinnin haasteet kasvavat mikäli solut ovat kooltaan pieniä ja mikäli niitä on tarkoitus visualisoida leikkeessä. SG:n neuronien kooksi on esitetty noin 25–50  $\mu\text{m}$  (Kobayashi 1998). Selkäydinleike-patch-clamp-sovelluksessamme nämä molemmat vaatimukset täyttyvät, joten haastetta visualisoinnille riitti. Visualisoinnissa käytettiin infrapunavalon hyödyntämiseen erikoistunutta QImaging-kameraa QICAM-IR ja Olympuksen BX51 WI-vesi-immersiomikroskooppia. Kuvien esikatselu, muokkaaminen ja tallentaminen tapahtuivat QCapture-ohjelman kautta. Ohjelman avulla voitiin säätää kameran optiset asetukset esikatselun aikana, jotta kuvista tulisi mahdollisimman tarkkoja. Yhdistettynä mikroskoopin säätöihin ohjelman avulla saatiinkin suhteellisen helposti kuvan parametrit kohdilleen ja näkyvyys leikkeessä varsin hyväksi. Usein riitti, kun säädettiin ohjelman valotusikkunasta valotus- ja vahvistusparametrit sopiviksi ohjelman histogrammin mukaisesti. Mikroskoopissa käytettiin infrapunasuodatinta resoluution parantamiseksi. Vesi-immersiomikroskopiassa saavutetaan tavanomaista mikroskopiaa

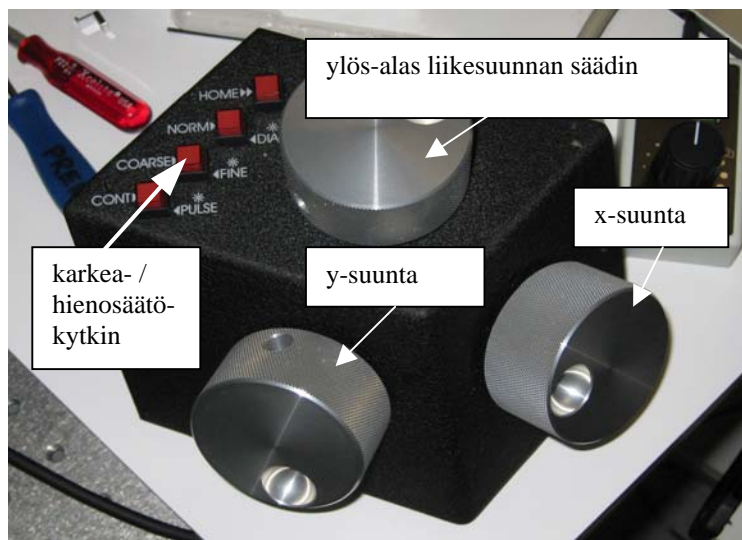
parempi resoluutio vältettäessä valon taipuminen näytteen, ilman ja objektiivin välisillä rajapinnoilla. Näytteen liikuttaminen tapahtui mikroskoopin tasoa liikuttamalla x- ja y-akselinsäädinten avulla ja samalla seurattiin kuvaa tietokoneen monitorin kautta.

#### 3.1.4. Mekaniikka

Laitteiston mekaaniseen hallintaan liittyviä osia ovat värinäestopöytä, mikromanipulaattori sekä U-putken siihen liitettyjen letkujen kautta toimiva paineensäätösystemi.

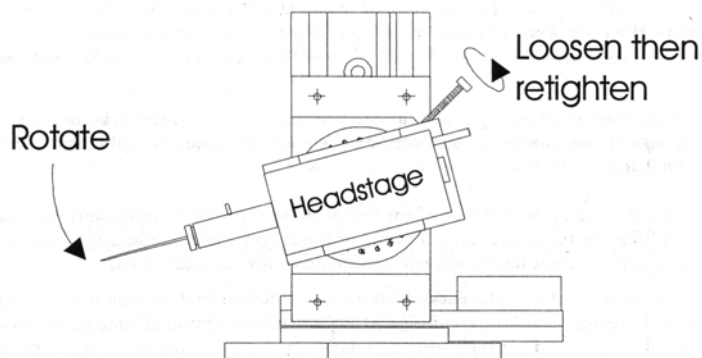
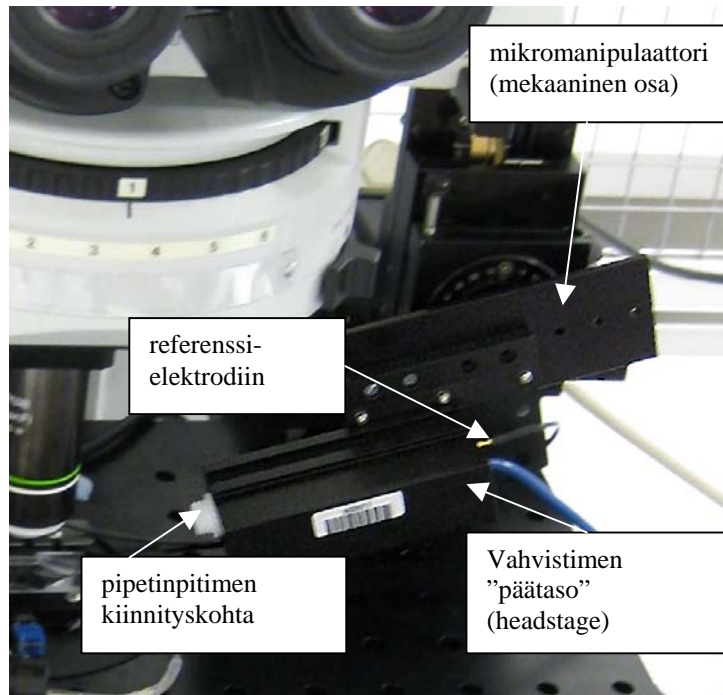
Faradayn häkin sisään erityisesti verkkovirtahäiriöltä suojaan sijoitetut laitteiston osat asetettiin värinäestopöydän päälle, mekaanisen stabiliteetin parantamiseksi pipetin ja mittauksen kohdesolun välillä. Värinäestopöydän toiminta perustui paineilman käyttöön. Värinäestopöytänä käytettiin IsoStation™ Vibration Isolated Workstation-pöytää. Tällainen värinäestopöytä tarjoaa suojan sekä vertikaalista että horisontaalista erityisesti 20–50 Hz värinää vastaan.

Laitteiston hienostuneimpiin osiin kuuluu kiistatta MP-285-tyyppinen mikromanipulaattori. Sen ROE-säädin (rotary optical encoder) oli todella käyttökelpoinen tarkassa ja hienovaraisessa kohdesolun lähestymisessä mittaustilanteessa. Kuvassa 3.3. näkyy tämä mikromanipulaattorin elektroninen osa.



**Kuva 3.3. Elektronisen mikromanipulaattorin ROE-säädin**

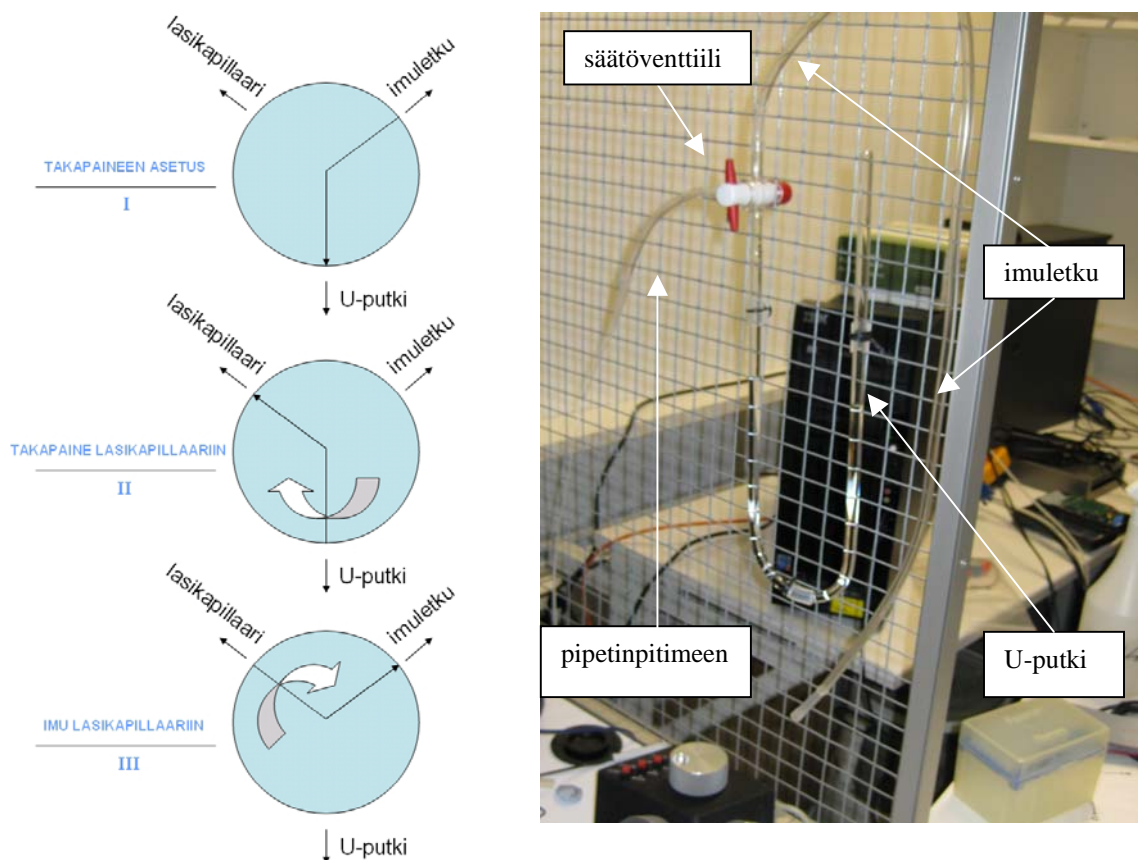
Jokaisessa kolmesta ROE-säätimellä kontrolloitavasta mikromanipulaattorin liikesuunnasta mikropulssien nopeus ja esiintymisrytmi riippuivat käyttäjän tavasta ja nopeudesta pyörittää kiertosäätimiä sekä siitä, oliko valittuna karkea/ vai hienosäätöinen etenemistyyli, joka määräsi yksittäisten kiertämisellä säädettävien mikroaskelten koon. ROE-säätimen digitaalinen ulostulo muunnettiin mikromanipulaattorin MP-285-ohjainyksikön kautta signaaleiksi, jotka liikuttivat mikromanipulaattorin askelmoottoreita. Ohjainyksikön, jonka paikka tietokoneen näytön alla näkyy kuvassa 3.6., avulla olisi ollut mahdollista ohjelmoida esimerkiksi ”kotiin”-käskyn avulla mikromanipulaattorin muistiin mittauselektrodin lähtöpaikka, jossa se voitiin mittausten välillä vaihtaa uuteen. Mittaussovelluksemme kannalta tällaisella ohjelmoidulla alkupisteeseen palaamisella ei nähty erityistä arvoa, joten sitä ei otettu käyttöön ja manipulaattorin liikkeitä tyydyttiin ohjaamaan manuaalisesti kiertosäätimiä pyörittämällä. Sen sijaan karkea-/hienosäätökytkimen käyttö osoittautui erityisen käyttökelpoiseksi. Mikromanipulaattorin avulla päästiin erityisen tarkkaan liikkeen resoluutioon, karkeasäätötilassa 0,2  $\mu\text{m}$  erotuskykyyn ja hienosäätötilassa jopa 40 nm liikkeen säätötarkkuuteen. Kuvassa 3.4. näkyy mikromanipulaattorin mekaaninen osa, johon vahvistimen päätaso ja sen kautta elektrodinpidin oli mekaanisesti ja elektronisesti yhdistetty. Mikromanipulaattorin mekaanisen osan optimointiin uhrattiin jonkin verran aikaa. Oikean lähestymiskulman ja -etäisyyden saavuttamiseksi lisättiin mekaaniseen osaan lisälevy. Huolellisesta laitteiston pystyttämisyvaiheesta suoritettua säädöstä huolimatta mekaanisen osan kulmaa jouduttiin vielä mittausten aikana hienosäätämään, mihin palataan vielä.



**Kuva 3.4.** Kuvan yläosassa laitteiston mikromanipulaattorin mekaaninen osa ja vahvistimen päätas, jonka etupuolella on kiinnityskohta pipetinpitimelle ja takapuolelle yhdistetään referenssielektrodin yhdyskaapeli ja alaosassa mikromanipulaattorin manuaalista peräisin oleva kuva mekaanisen osan kulman säätämisestä. Alempi kuva on valmistajan manuaalista.

Lasinpuhaltajalla tilaustyönä valmistettu U-putki yhdistettiin pipetinpitimeen muoviputkien avulla. U-putkesta lähti myös imuletku, jonka päähän yhdistettiin pipetinkärjestä muotoiltu suukappale, jonka kautta voitiin imeä tai puhaltaa. U-putkeen laitettiin vettä, ja paineensäätöominaisuus perustuikin tämän vesipatsaan korkeuden säätämiseen kokeen aikana kokeen eri vaiheissa. Laitteiston pystyttämävaiheessa imun voimakkuutta optimoitiin käyttämällä jäykkäseinäisiä muoviputkia ja katkaisemalla ne mahdollisimman

lyhyiksi optimaalisen voimakkaan imutehon aikaansaamiseksi ja varmistamalla putken osien liitoskohtien pitävyys. Myös pipetinkärjestä muokatun suokappaleen reikää suurennettiin imutehon optimoinnin tarkoituksessa. U-putken rakennetta ja toimintaa havainnollistaa kuva 3.5. Takapaine asetettiin puhaltamalla putkeen suokappaleen kautta. Puhalluksen aikana U-putken venttiili sulki yhteyden U-putken ja pipetin välillä. Sopiva nestepatsaan korkeus, joka oli noin neljän cm luokkaa, lukittiin kääntämällä U-putken venttiiliä puhaltamisen jälkeen siten, että U-putki yhdistyi pipettiin ja nestepatsas aiheutti takapaineen pipettiin. Takapaineen poistovaiheessa gigaliitosta tehtäessä U-putken venttiili käännettiin hyvin nopeasti yhdistämään imuputki ja pipetti ja hyvin pian tämän takapaineen poistamisen jälkeen lisättiin U-putken kautta välittyvä kevyt imu. Paineensäädön roolia mittaustilanteessa käsitellään mittausten teknistä suorittamista koskevassa luvussa tarkemmin.



**Kuva 3.5. Lasikapillaarielektrodin imu-/takapainejärjestelmä. Säätöventtiilin asentoja I, II ja III vaihtamalla voidaan lasikapillaarin paine asettaa mittaasetelman kulloisenkin vaiheen vaatimusten mukaiseksi. Kaavakuvan ympyrän sisällä olevan mustan nuolen suunta osoittaa paineen suunnan.**

### 3.1.5. Elektroniikka

Patch-clamp-laitteiston elektronisista komponenteista tärkein on vahvistin ja siinä erityisesti vahvistimen päätaso. Se on virtajännitemuunnin, joka suoraan mittaa ja vahvistaa mitattavia soluvirtoja (Scott-Ward ym. 2003). Rakennetun laitteiston elektronisiin komponentteihin kuuluu vahvistimen lisäksi A/D-muunnin. Vahvistin ja muunnin yhdistettiin toisiinsa vahvistimen ohjelmistoa asennettaessa esiin tulleiden vaiheittaisten toimenpiteiden osoittamalla tavalla kiinnittämällä yhdistävät johtimet oikeisiin ulos- ja sisätuloihin. Sekä vahvistimen että mitattavan signaaliin digitalisointiin käytetyn muuntimen toiminta oli kiinteässä yhteydessä tietokoneeseen. Mittauksissa käytetty tietokone oli IBM Intellistation M Pro, joka osoittautui käytössä toimivaksi ja riittävän tehokkaaksi mittausten suorittamiseen. Suurempikokoinen ja tilan rajallisuuden takia mielellään litteä näyttö olisi tulevaisuudessa mukava lisä laitteistoa edelleen kehitettäessä samanaikaisesti käytössä olevien ikkunoiden määrän ollessa koetilanteessa suuri. Samanaikaisesti halutaan pitää esillä ja käytettävissä esimerkiksi membraanitestivalikkoa pipetin kärjen vastuksen seuraamiseksi, vahvistimen ohjausvalikkoa eri mittausteknisten toimintojen suorittamiseksi ja kameran kuvaa mitattavan solun tarkastelemiseksi. Lisätila näytöllä helpottaisi näiden ikkunoiden käyttöä. Erilaisilla ohjelmistoilla oli keskeinen laitteiston toiminnan monitorointia ja ohjaamista suorittava merkitys. Mittaustiedon keruuohjelmana käytettiin Clampex-ohjelman uusinta versiota Clampex 10.0. Mittaustiedon analysoinnissa hyödynnettiin niin ikään uusinta versiota, Clampfit 10.0-analyysiohjelmaa. Nämä molemmat ohjelmat kuuluivat pCLAMP 10 -ohjelmistopakettiin. IR-DIG-kuvien tarkasteluun, muokkaamiseen ja tallentamiseen käytettiin puolestaan QCapture-ohjelmaa.

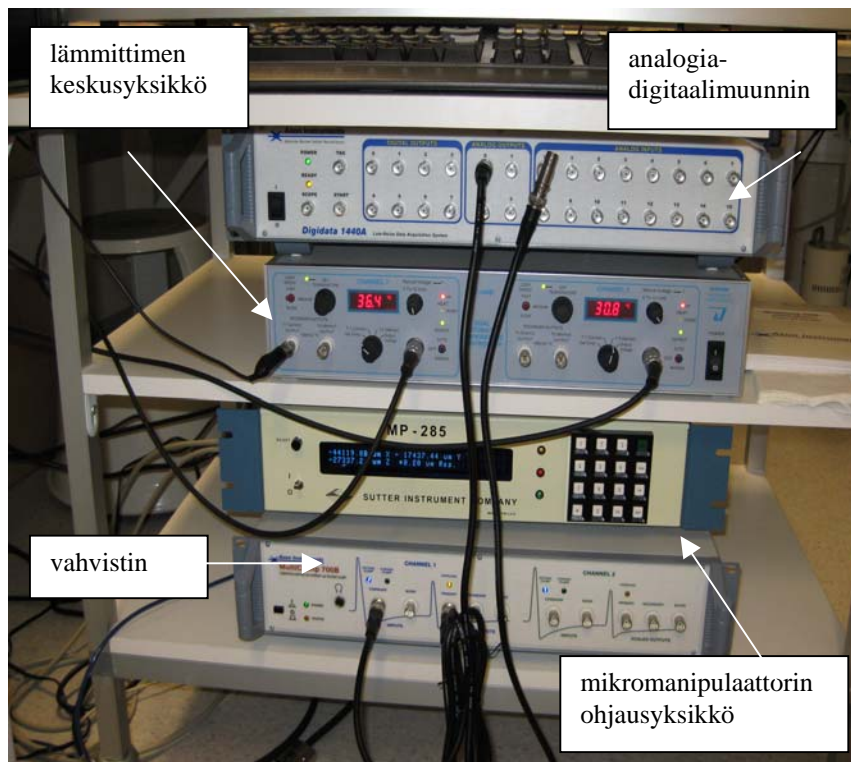
Laitteiston vahvistimena toimi MultiClamp 700B, tietokoneohjattu mikroelektrodin virta- ja jännitevahvistin. Multiclamp 700B on analoginen sisääntulo/ulostulo-vahvistin kuten konventionaaliset vahvistimet (Multiclamp 700b). Perinteisen etupaneelin säätökoskettimien ja vipujen sijaan vahvistinta ohjataan ohjelmistopohjaisesti MultiClamp 700B-kontrolli-ikkunan kautta, joka kommunikoi vahvistimen kanssa USB-kaapelin välityksellä. Tämän kontrollirajapinnan kautta onnistuvat säädöt kuten pipetin offset-kompensaatio, pipetin ja kokosolun kapasitanssikompensaatio sekä niinkin korkeatasoiset

toiminnot kuin systeemin suojaaminen oskillaatiolta. Esimerkiksi sarjaresistanssikompensaatiota tehtäessä ohjelma automaattisesti varoitti oskillaatiosta, mikäli prosentuaalinen  $R_s$ -kompensaatio oli säädetty liian korkeaksi. Näin saatiin nopeasti tätä kompensatioaroa pienentämällä estettyä solun tuhoutuminen ja mittausta pystyttiin jatkamaan, kunhan sopiva kompensaatiotaso oli löydetty. Vahvistimen asetukset kuten vahvistus, suodatuksen frekvenssi, kokosolun kompensatio ja mittauksen tallennustila välitettiin automaattisesti suoraan mittaustiedon keruuhjelmalle. Multiclamp 700B - ohjausrajapinta on itsenäinen datankeruulaitteistosta mukaan lukien tähän tarkoitukseen käytetyt ohjelmistot. Kuitenkin saman valmistajan tarjoamat Pclamp-ohjelmisto ja Digidata 1440A -digitalisointilaitteet takaavat täydellimmän ja yhtenäisimmän ratkaisun (molecular-devices www), johon päädyttiinkin diplomityössä pystytetyn laitteiston osalta. Vahvistimen mikromanipulaattorin mekaaniseen osaan yhdistettiin sen CV-7-tyyppiä oleva päätaso-osa, joka on tarkoitettu mittaussignaalin matalahäiriöiseen ja joustavaan mittaamiseen. Siihen voitiin yhdistää myös vahvistimeen kuuluva mallisolu PATCH-1U, jonka avulla laitteiston toimintaa voitiin testata laitteiston pystytysvaiheessa ja myöhemminkin erilaisissa epämääräisissä häiriötilanteissa, joissa häiriölähdettä pyrittiin paikallistamaan. Mallisolua käytettiin laitteiston pystyttämävaiheessa vahvistimen toiminnan kalibraatiossa. Laitteiston kokoamisvaiheessa testattiin MultiClamp 700B-ohjausikkunan käskyjen toimivuutta ja häiriötasoa.

Jotta alipäästösuodatettu patch-clamp-vahvistimen analoginen signaali saataisiin muunnettua digitaaliseksi virtasignaaliiksi tietokonetarkastelua, analyysia ja tallentamista varten, tarvitaan analogi-digitaalimuunnin. Rakennetun laitteiston Digidata 1440A-digitaalimuunnin on korkean erotuskyvyn matalahäiriötasoinen muunnin, joka yhdistettiin vahvistimeen ja jonka tehtävä oli lähettää ja ottaa vastaan signaaleja vahvistimelta sekä kommunikoida tietokoneen kanssa USB 2.0-kaapelin kautta. Digidata 1440A-digitaalimuunnin on kytke-ja-käytä-tyyppinen laite, jonka Windows automaattisesti tunnistaa. Digidata 1440A digitaalimuunnin digitoi sen 16 itsenäistä analogista sisääntulotulokanavaa 250 Hz taajuudesta ylöspäin kunkin ja sillä on neljä itsenäistä 16-bittistä analogista ulostuloa. Siinä on myös kahdeksan digitaalista ulostuloa (0-7) etupaneelissaan, joille sovelluksessamme ei tosin ollut käyttöä. Laitteistossamme tarvittiin



ainoastaan yhtä analogista sisääntuloa ja yhtä analogista ulostulokanavaa, jotka kytkettiin Multiclamp 700B-vahvistimen etupaneeliin kanavalle 1. Digidata 1440A:n asentaminen ja käyttöönotto olivat suhteellisen suoraviivaisia toimintoja ja pCLAMP 10-ohjelmisto sisälsi myös Digidata 1440A:n ajurit. Vahvistin ja digitaalimuunnin, kuten muutkin tietokoneen näytön alle sijoitetut laitteiston osat, näkyvät kuvassa 3.6.



**Kuva 3.6.** Kuvassa näkyvät kahdella kaapelilla toisiinsa yhdistetyt A/D-muunnin ja vahvistin sekä muita laitteiston osia.

### 3.1.6. Laitteiston esitestaaminen

Patch-clamp-laitteiston toiminnan mahdollisimman tarkka optimointi esitestaamisen kautta ennen varsinaisten mittausten aloittamista on ensiarvoisen tärkeää. Sähköiset ominaisuudet testataan mallisolun avulla ja samalla saadaan testattua asennettujen ohjelmistojen toimivuus. Mikroskoopin optiikka säädetään kohdilleen ja samoin kameran asetukset mahdollisimman tarkan kuvan aikaansaamiseksi. Perfuusion toimivuus ja sopiva nopeus säädetään myös ennen mittausten aloittamista. Mikromanipulaattorin toiminta ja sen hallinta tulee myös olla korkealla tasolla ennen varsinaisten kokeiden aloittamista. Pipetinpitimen oikea kulma on aiheellista koettaa säätää mahdollisimman sopivaksi jo tässä

vaiheessa. Väärä kulma voi aiheuttaa esimerkiksi sen, että pipetinpidin ottaa kiinni mittausaltaan reunan estäen näin pipetin pääsyn mittauksen kohdesolun saavuttamisen kannalta riittävän syvälle leikkeessä. Pipetinpitimen vääränlainen asento saattaa myös estää kokonaan kohdealueen saavuttamisen. Sen asento tulee optimoida kaikissa kolmessa liikesuunnassa. Mittausten kuluessa kulma saattaa ikävä kyllä vaatia uudelleen optimointia esimerkiksi siitä syystä, että on jouduttu syystä tai toisesta vaihtamaan leikettä ja uuden leikkeen paikka mittausaltaassa ei ole aivan suotuisa säädetyille pipetinpitimen parametreille. Tämä ei ole kuitenkaan mikään ylitsepääsemätön ongelma. Joskus vaatii kuitenkin jonkin verran kärsivällisyyttä säätää kulma kohdilleen ja tässä tuhraantuu myös helposti muutama pipetti uudelleensäädetyin kulman testaamiseen. Usein kulman säätäminen on hyvin pienestä kiinni, eikä ole lainkaan tavatonta, että pipetillä pääsee aivan kohdesoluksi valitun neuronin solukalvon tuntumaan, ennen kuin huomaa, ettei pipetin liikkumavara aivan riitäkään kohdesolun ja pipetin välisen gigaliitoksen synnyttämiseen. Tässäkin säätämisessä harjaannuttiin tosin onnistumaan nopeasti toistojen kautta.

Sähkölaitteiden toiminnasta aiheutuva sähköinen häiriötaso tulee pyrkiä saamaan mahdollisimman alhaiseksi ennen rekisteröintien aloittamista. Erityisesti 50 Hz verkkohäiriö tuli pyrkiä kokonaan eliminoimaan laitteistolla rekisteröitävän signaalin siistimiseksi esimerkiksi maadoitusten kautta. Tähän suurin vaikutus oli lämmityslaitteesta Faradayn häkkiin vedetyllä maadoituskaapelilla.

### 3.2. Esivalmistelut

Tässä luvussa käydään läpi kaikki valmistelevat toimenpiteet, jotka ovat varsinaisen mittaamisen edellytyksenä. Keskeisimpiin selkäydinleikekokeiden esivalmisteluihin kuuluvat niin liuosten, pipettien kuin leikkeidenkin tekeminen. Esivalmistelujen optimointi oli ehdottomasti aikaavievin ja haastavimmaksi osoittautunut kohta diplomityön koeasetelman toteuttamisessa.

### 3.2.1. Liuokset

Menestyksekkäässä selkäydinleikkeiden tekemisessä ja säilyttämisessä ovat tärkeässä roolissa sopivien liuosten käyttö leikkeidenteko-, inkubaatio- ja mittaustilanteissa. Tässä luvussa esitellään tutkimuksessa käytetyt liuokset ja niiden valmistus.

#### Ekstrasellulaariliuos:

NaCl	117 mM [SIGMA]
KCl	3,6 mM [SIGMA]
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5 mM [Merck]
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM [Merck]
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM [Merck]
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM [SIGMA]
glukoosi	11 mM [Riedel-de Haën]

Solunulkoisen liuoksen koostumus on sama kuin Yoshimuran ja Nishin tutkimuksessa käytetty (Yoshimura & Nishi 1993). Tätä solunulkoista liuosta valmistettiin aina kerralla viisi litraa. Yhden päivän kokeellinen työ vaati yhdestä puoleentoista litraan solunulkoista liuosta. Selkäydinleike-ekstrasellulaariliuosta tehtäessä kuiva-aineet liuotettiin noin neljän litran tilavuuteen milli-Q-vettä magneettisekoittajaa apuna käyttäen ja vasta tämän jälkeen säädettiin tilavuus milli-Q-vedellä tarkasti viiteen litraan. Lopuksi mitattiin osmometrillä liuoksen osmolaliteetti. Kokeellisen työn aikana käytettyjen ekstrasellulaariliuoserien osmolaliteetit vaihtelivat välillä 279–284 mOsm. Lopuksi jaettiin viiden litran tilavuus viiteen lasiseen mittapulloon, jotka säilytettiin kylmähuoneessa mittausten väliaikana. CaCl ja NaHCO<sub>3</sub> liuotettiin aina omina erinään ennen lisäämistä muiden aineiden joukkoon, etteivät aineet sakkaisi, vaan liuos on kirkasta ja koostumukseltaan tasaista. Tätä liuosta perforoitiin koko mittauksen ajan mitta-altaaseen, jossa leike oli. Liuos laitettiin aina heti päivän alkajaisiksi Faradayn häkin päälle happikuplitukseen (kaasusuhde 95% happi/5% hiilidioksidi) odottamaan mittausten aloittamista. Sitä käytettiin myös dekantterissa, johon leikkeet siirrettiin säilytettäväksi päivän ajaksi suoraan leikkurista. Tässä leikkeiden inkubaatioon käytetyssä astiassa oleva ekstrasellulaariliuos laitettiin myös heti aamusta happikuplitukseen. Molemmat kuplitukset pidettiin päällä koko päivän ajan

aina mittausten loppuun saakka. Leikkeiden solujen hengissä säilymisen kannalta tämän happikuplituksen merkitys on keskeinen.

Leikeliuos tehtiin aina kahden litran tilavuuteen. Sitä käytettiin disekoitujen selkäydinpreparaattien säilytysdekanterissa sekä leikkurissa. Aineet liuotettiin noin 1,2 litraan milli-Q-vettä ja tämän jälkeen säädettiin pH:n 7,4:ään 2 M NaOH:lla pH-mittarin avulla. Osmolariteetti säädettiin jälleen osmometrin avulla arvoon, joka sijoittui välille 300–304 mOsm/l lisäämällä milli-Q-vettä tarvittava määrä.

#### Leikeliuos:

sakkaroosi	250 mM
KCl	2,5 mM [SIGMA]
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 mM [Merck]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4 mM
glukoosi	11 mM [Riedel-de Haën]
HEPES	15 mM [SIGMA]

Intrasellulaariliuosta, jonka resepti on alla, kokeiltiin sellaisenaan sekä tämän lisäksi laimennettuna 111µl/5 ml- ja etenkin 222µl/5ml -suhteessa milli-Q-vedellä huolellisesti vorteksilla sekoittaen Eppendorf-putkessa liuoksen ja milli-Q-veden keskenään tasakoostaisen liuoksen aikaansaamiseksi. Täumä resepti on Kosugin ja Nagatsukan ttkimuksesta (Kosugi ym. 2007).

#### Intrasellulaariliuos:

kaliumglukonaatti	135 mM [SIGMA]
KCl	5 mM [SIGMA]
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5 mM [SIGMA]
MgCl <sub>2</sub>	2 mM [Merck]
EGTA	5 mM
HEPES	5 mM [SIGMA]
ATP-Mg	5 mM

Tässä pH oli säädetty 7,2:een ja osmolaarisuus 285 mOsm/l. Liuos pakastettiin 4 ml:n erissä Eppendorf-putkissa.

Koeasetelmassamme solunulkoisen liuoksen tulisi olla intrasellulaarista väkevämpää optimaalisten koeolosuhteiden aikaansaamiseksi. Intrasellulaarisen liuoksen tulisi siis olla hypo-osmolaarinen verrattuna ekstrasellulaariliuokseen. Tämän mahdollisimman optimaalisen ekstrasellulaari/intrasellulaari osmolaarisuussuhteen löytämiseksi kokeiltiin edellä kuvatulla tavalla valmistettuja laimennoksia. Näistä 222 µl -laimennoksella saatiinkin sopiva osmolariteettiero aikaiseksi. Tämä liuos osoittautui gigaliitosten tekemisessä erittäin toimivaksi, kuten myös seuraavaksi esiteltävä Safranov-artikkelin reseptin mukainen intrasellulaariliuos.

Safranovin ja kumppanien artikkelin mukainen intrasellulaariliuos (jonka käyttöön lopulta päädyttiin):

KCl	3 mM [SIGMA]
K-glukonaatti (=D gluconic acid)	150,5 mM [SIGMA]
MgCl <sub>2</sub>	1 mM [Merck]
BAPTA	1 mM [Merck]
HEPES	10 mM [Merck]

Tätä mittapipetintäyttöön tarkoitettua intrasellulaariliuosta valmistettiin kerrallaan 100 ml tilavuus, joka jaettiin 5 ml Eppendorf-putkiin. Kuiva-aineet liotettiin 90 ml:aan milli-Q-vettä, minkä jälkeen säädettiin liuoksen pH 7,3:een KOH:lla. Lopuksi täytettiin tilavuus tarkasti 100 ml:aan milli-Q-vedellä. Liuosta sisältävät putket pakastettiin.

Perforaatio-patch-clamp-kokeissa käytetty amfoterisiini-B punnittiin ensin noin 4-6 mg erissä tarkkuusvaa'an avulla erillisiin muoviputkiin ja kunkin erän tarkka paino kirjattiin ylös. Tämän intrasellulaariliuoksen valmistuksessa hyödynnettiin alla esitetyn reseptin mukaista intrasellulaariliuosta, johon sekoitettiin dimetyylisulfoksidiin (DMSO) huolellisesti liotettua (vortekointi Vortex-sekoittimella ja sonikointi sonikaattorilla) amfoterisiini-B-kuiva-ainetta. Kun amfoterisiini-B:n sisältävä DMSO oli sekoitettu

intraselulaarisuokseen, käytettiin tämä valmis liuos vielä kertaalleen sonikaattorissa, sillä amfoterisiini-B on vaikeasti liukenevaa ainetta, jonka rakenne sonikaattorilla saatiin tehokkaasti rikottua ja aine näin ollen liuotettua. Liuos valmistettiin siten, että lopullisessa intraselulaarinesteessä amfoterisiini-B:n määrä oli 100 µg millilitraa kohti. Amfoterisiini-B on valoherkkää ainetta, joten täyttörüisku säilytettiin kokeen ajan pimeässä. Amfoterisiini-B:n kuiva-aine-erät säilytettiin jääkaapissa koepäivien välillä niin ikään valolta suojatussa säilytyslaatikossa. Amfoterisiinin käytön toinen haaste oli, että aine on optimaalisen tehokas vain 1-3 tuntia liuotuksesta, joten uusi liuos jouduttiin valmistamaan tarvittaessa useamman kerran yhtenä mittauspäivänä.

#### Intraselulaariliuos:

NaCl	5 mM [SIGMA]
K-glukonaatti	145 mM [SIGMA]
HEPES	10 mM [SIGMA]

Nämä aineet liuotettiin 90 ml:aan milli-Q-vettä ja pH säädettiin KOH:lla 7,3:een. Tämän jälkeen lisättiin liuoksen milli-Q-veden määrää niin, että lopputilavuudeksi saatiin 100 ml. Tämä tilavuus jaettiin 5 ml Eppendorf-putkiin ja putket säilytettiin pakastettuina.

Kuten liuosten resepteistä nähdään, niiden koostumukset ovat hyvinkin kirjallisuuskatsausosiossa esiteltyjen periaatteiden mukaisia.

#### 3.2.2. Pipettien valmistaminen ja täyttö

Mittauksissa käytetyn pipetin parametrien sekä pipettilasien ominaisuuksien valinnan kriittisyys korostuivat koeprotokollan optimoinnissa ja osoittautuivat lopulta koko mittauksen suorittamisen kannalta ratkaisevaksi tekijäksi.

Perforaatio-patch-mittauksen alkuvalmistelut tehtiin ja kokosolumittauskonfiguraatioon tätä kautta siirtymistä yritettiin yhteensä 16 mittauspäivänä ja kokosolu-patch-clamp-mittauksen alkuvalmistelut tehtiin sekä kokosolumoodiin siirtymistä yritettiin 13 mittauspäivänä ennen läpimurron tapahtumista. Usko oli koetuksella ennen kuin ratkaiseva lasimateriaali ja sille sopivat parametrit löydettiin. Tämän jälkeen kokosoluvirtamittaustilanteeseen siirtyminen

onnistui vähintäänkin joka kolmannella yrittämällä. Yritysten lukumäärästä johtuen voidaan melko suurella varmuudella sanoa, että ratkaiseva tekijä oli nimenomaan pipetin lasimateriaali. Aiemmin sovelletulla lasimateriaalilla oli ehditty kokeilla pipetin vetoparametrejäkin hyvin laajasti, vastusten vaihdellessa yhdestä megaohmista lähelle kahtakymmentä. Gigaliitoksen aikaansaaminen sinänsä ei ollut erityisen ongelmallista ennen läpimurtoa sovelletulla lasimateriaalilla valmistetuilla pipeteilla. Sen sijaan solun rei'ittäminen tuolloin hyödynnetyillä pipeteilla osoittautui ylitsepääsemättömän vaikeaksi.

Ennen rei'ittämisen onnistumista pipetit valmistettiin standardin mukaisista borosilikaattilasipipeteistä, joissa OD/ID-suhde oli 1,5:0,86. Empiirisen kokeilun tuloksena saatiin ohjelma, jonka parametreillä valmistetuilla pipeteilla onnistuttiin lähes kaikkina mittauksen yrityspäivinä saamaan aikaan gigaliitoksia. Ohjelmalla saatujen pipettien vastukset käytetyillä liuoksilla asettuivat välille 4-13 M $\Omega$ . Myös pipetinvetolaitteessa valmiiksi ohjelmoituna ollut, laboratoriossa rutiinimaisesti tutkittavien solutyypin manuaali-patch-clampissa sovellettu ohjelma, tuotti leikepatch-clamp-sovelluksessa gigaliitosten tekoon soveltuvia pipettejä, joiden vastus käytetyissä liuoksissa asettui välille 2-6 M $\Omega$ . Ennen solun rei'ittämisen onnistumista käytettiin pipetinvetolaitteena Sutter Instrument co:n horisontaalista vetolaitetta, jonka malli oli P-2000. Tämä laite näkyy kuvassa 3.7.



**Kuva 3.7. Käytetty pipetinvetolaite P-2000. P-2000 yhdistää CO<sub>2</sub>-laserpohjaisen lämmityslähteen ja perinteisen vetolaiteteknologian. Lämmönlähteeksi P-2000 on valittu CO<sub>2</sub>-laser useasta syystä. Kvartsi, borosilikaatti ja muut perinteiset pipetinvalmistusmateriaalit voidaan sulattaa sopivalla laservalolla,**

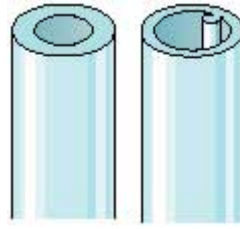
minkä lisäksi laserlämmitys on puhdas lämmitystapa ja siinä ei ole mahdollisuutta, että pipetin kärkeen jäisi metallijäämiä, kuten perinteisissä lämmitykseen käytettävissä filamenteissa. Laser voidaan myös säätää hetkessä päälle ja pois päältä, toisin kuin perinteinen filamentti. Käyttäjä voi helposti ohjelmoida käytetyn lämmön määrän ja jakautumisen eri lämmityssykleiden välille (Sutter, [www-sivu](#)). Lasikapillaari kiristettiin kuvassa keskellä näkyvän kammion sisään molemmilta puolin ja kammion sisällä laser lämmitti kapillaarin keskiosaa samalla kun kapillaarin päitä vedettiin erilleen säädetyillä vetoparametreilla; vedon nopeutta ja voimakkuutta voitiin säätää. Nämä lämmitykset ja vedot tapahtuivat sykleissä ja eri ohjelmat saatiin talletettua vetolaitteen muistiin.

Läpimurtopipetit valmistettiin Sutter instruments co:n horisontaalisella vetolaitteella P-80/PC. Läpimurron yhteydessä ja sen jälkeisissä mittauksissa hyödynnettävät pipetit olivat huomattavasti ohuempia kuin aiemmin käytetyt. Niiden OD/ID-suhde oli 1,5:1,12. Lisäksi nämä borosilikaattilasipipetit sisälsivät filamentin. Tässä ohjelmassa lämmityslämpötilat olivat huomattavasti korkeammat kuin aiemmin hyödynnettyjen pipettien vetovaiheessa käytetyt. Aiemmissa ohjelmissa lämmityslämpötilat sykleissä vaihtelivat välillä 325–700 C°, kun läpimurtopipeteissä käytetyt lämpötilat asettuivat välille 714–735 C°. Mitä korkeampi lämmityslämpötila sitä pidemmäksi pipetin kärki muotoutuu ja sitä korkeampi niiden kärjen resistanssi on. Myös vetoparametrien arvot olivat läpimurtopipeteissä korkeammat. Vetoparametrien arvojen kasvattaminen vaikuttaa pipetin kärjen muotoon samansuuntaisesti kuin lämmön kasvattaminen. Nämä lukuarvot eivät toki ole suoraan verrattavissa, sillä aiemmin hyödynnettyjä ohjelmiahan sovellettiin paksumpiseinäiseen lasimateriaaliin, kun taas läpimurtopipetit olivat ohutseinäisiä.

OD/ID-suhde, jota suositellaan kokosolu-patch-clamp-mittapipeteille, on 1,2–1,4. Läpimurtopipettien ulko-/sisähalkaisijan suhde asettuu juuri tälle välille. Tämän suhteen toimivuus perustuu sen matalampaan vastukseen annetulle kärjen ulkohalkaisijalle kuin paksumpiseinäisissä pipeteissä (Walz 2002). Toimimattomiksi todetuissa pipeteissä tämä suhde oli 1,7 eli ylitti yllä esitetyn suosituksen.

Toimivien pipettien tehokkuuden avaimena oli luultavasti ainakin ulkoseinä/sisäseinä suhteen pienuus eli toisin sanoen lasin ohuus. Pipetin kärjen kohdalla tämä suhde pysyy vakiona, vaikka kärjestä tulee ohuempi. Kuvassa 3.8. näkyy standardipipetin sekä läpimurtopipetin läpileikkaus.





**Kuva 3.8. Pipettien läpileikkauskuva Vasemmalla puolella standardityyppinen paksuseinäinen pipetti ja oikealla puolella kapeaseinäinen filamentillinen lasikapillaari (World Precision Instruments, www-sivu).**

Pipetit valmistettiin yksinkertaisesti katkaisemalla lasiputki lasin leikkaamiseen tarkoitettulla pienellä sahalla ennalta määrätyn pituiseksi, minkä jälkeen sulatettiin lasikapillaareja tylsästä päästään kaasuliekillä, etteivät ne kuluttaisi kloridointipintaa mittaalektrodin kärjestä liian nopeasti. Seuraavassa vaiheessa ne pyyhkäistiin keskikohdastaan etanolilla, jotta syntyvien kahden lasikapillarin kärjet olisivat varmasti puhtaita. Sitten kapillaari asetettiin vetolaitteeseen niin että valmistuvat kaksi pipettiä olisivat mahdollisimman tasamittaiset, mikä osaltaan myötävaikuttaa siihen, ettei mikromanipulaattorin kulmaa tarvitse uudelleen säätää pipetin vaihdon ja eri solujen rekisteröintien välillä. Tämän jälkeen valittiin laitteeseen tallennettu sopivaksi todettu ohjelma.

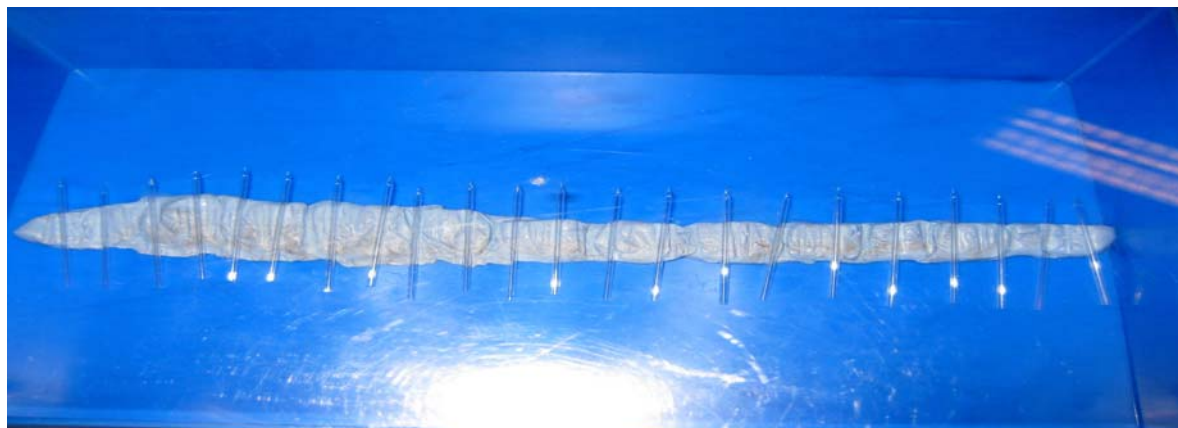
Pipetin täyttöliuos on aina steriilifiltroitava ruiskun kärkeen asetettavan 0,2 µm suodattimen läpi. Kärjen täyttäminen tapahtui kaksivaiheisesti; ensin kärki täytettiin ruiskun alipaineen avulla ja tämän jälkeen pipetti täytettiin takaapäin ruiskulla, jonka kärjessä oli pitkä neula. Pipetti täytettiin ainoastaan korkeuteen, jossa sen sisään laitettava kloridoitu hopealanka ylsi nesteeseen. Ylimääräinen neste pipetin sisällä olisi aiheuttanut turhaa kohinaisuutta mittaustilanteessa. Pipettiä täytettiin niin pitkälle, että vain noin 1-2 mm Ag/AgCl-elektrodista upposi pipetin täyttönesteeseen. Filamentin sisältävää pipettiä ei periaatteessa tarvitse täyttää kaksivaiheisesti. Kaksivaiheisen täytön tarkoitus on nimenomaan varmistaa, että aivan pipetin kärkeen asti pääsee täyttöliuosta. Filamentillisen pipetin tapauksessa filamentti johtaa nesteen automaattisesti pipetin kärkeen saakka. Täyttäessä on tärkeää naputella sormenpäällä mahdolliset kuplat pipetin kärjestä pois, etteivät ne häiritse

sähköisen yhteyden toimivuutta pipetin läpi. Ilmakuplat pipetissä voivat aikaansaada avoimen virtapiirin estäen näin virran mittaamisen. Kaksivaiheisessa täytössä kuplia automaattisesti ilmaantui ainakin täyttötilavuuksien väliin. Siirryttäessä ohutseinäisiin pipetteihin tämä naputteluvaihe tuli suorittaa entistäkin hellävaraisemmin, jottei pipetin kapea kärki rikkoutuisi. Amfoterisiini-B:n sisältävissä mittauksissa kaksivaiheinen täyttö oli erityisen keskeisessä roolissa. Kärki täytettiin täyttöruiskun imun avulla aivan normaalilla intrasellulaariliuoksella ja takaapäintäyttö suoritettiin amfoterisiini-B:tä sisältävällä liuoksella. Sillä hetkellä, kun täyttöjen välinen kupla oli näpätetty sormilla pois, alkoi amfoterisiin diffundoituminen kohti pipetin kärkeä. Tällöin tuli koettaa toimia nopeasti pipetin asettamisessa pipetinpitimeen ja sen saattamisessa mittaukseen valitun kohdesolun pintaan, jotta gigaliitoksen tekovaiheessa pipetin kärjessä olisi vielä normaalia intrasellulaariliuosta ja vasta gigaliitoksen synnyttyä amfoterisiini-B alkaisi virrata solun kalvoon rei'ittäen sen. Kuitenkin kokeen järkevän keston kannalta ja solujen kunnan optimoinnin kannalta on tärkeää, ettei amfoterisiini-B:n solukalvolle virtaamisen alkaminen kestä liian kauaa. Oikea täytösuhde löydettiin kokeilujen kautta.

Pipetin täyttötilanteessa karkea arvio kärjen läpimitasta ja siten pipetin soveltuvuudesta voitiin tehdä jo täyttövaiheessa kokemukseen perustuvilla havainnoilla siitä, kuinka helposti ja pitkälle pipetin kärki täyttyi ruiskulla imettäessä. Luonnollisesti liian suurihalkaisijainen pipetin kärki täyttyi paljon helpommin ja pidemmälle kuin kapeampihalkaisijainen kärki, jonka vastus oli suurempi. Kaksivaiheisen täytön välissä ja jälkeen katsottiin aina valomikroskoopilla, oliko pipetin kärjessä kuplia ja naputeltiin etusormella mahdollisesti kuplat pois. Tällä täytetyn lasipipetin mikroskoopin avulla suoritettulla tarkastelulla säästettiin huomattavasti aikaa. Ilman tätä vaihetta mahdolliset kuplat olisi havaittu vasta, kun laitteistoon liitetyn pipetin vastus mitattiin ja havaittiin sen olevan liian korkea tai viimeistään kun laitteistoon liitetyn pipetin kärki saatiin tarkennettua laitteiston mikroskoopin fokukseen ja nähtiin siellä oleva kupla. Tässä tarkoituksessa käytettiin samaa valomikroskooppia kuin selkäydinpreparaatin käsittelyvaiheessa.

Pipetit tuli valmistaa ja täyttää aina samana päivänä juuri ennen mittausta. Mikäli pipetti on pidemmän aikaa suolaliuoksella täytettynä, se murentuu. Kuvassa 3.9. näkyvät yhtenä

mittauspäivänä hyödynnetyt borosilikaattilasipipetit. Ne säilytettiin kannellisessa rasiassa, kun ne oli poistettu vetolaitteesta, ettei kärkeen pääsisi pienäkään roskaa.



**Kuva 3.9. Borosilikaattilasipipetit säilytysrasiassa**

Tulevaisuudessa pipettien toimivuutta voitaisiin edelleen optimoida esimerkiksi pinnoittamalla niitä. Pipetin seinämän ollessa eristeenä kahden johtavan liuoksen välillä se toimii kapasitaattorina ja siten häiriölähteenä. Kapasitanssi on kääntäen verrannollinen seinämän paksuuteen, joten paksummalla lasilla se on matalampi. Kapasitanssia voidaan siten pienentää päällystämällä pipetti ei-johtavalla materiaalilla. Toinen keino on pipettien kiillotus. Laboratorioon tilattiinkin kiillotuslaite tulevaisuuden pipettiominaisuuksien vielä parempaa optimointia silmällä pitäen. Kiillotuksen ideana on puhdistaa pipetin kärki entistäkin tehokkaammin. Tällä taataan pipetti-solukalvo-yhteyden puhtaus ja näin ollen helpotetaan gigaliitoksen muodostumista. Pipetin kärki voidaan siten puhdistaa ja pehmentää tällaisella kiillotuslaitetekäsitelyllä (Walz 2002).

### 3.2.3. Koe-eläimet

Kokeissa, joissa ei onnistuttu aikaansaamaan reikää solukalvon pintaan, eikä näin ollen päästy rekisteröintilanteeseen asti, koe-eläiminä käytettiin sekä kontrolli- ja että diabeettisten koe-eläinrottien tapauksessa Han Wistar -urosrottia. Kokeissa, joissa kokosolumittauskonfiguraatioon päästiin, käytettiin uroskontrollirottia, jotka olivat tätä samaa rotua, kun taas rekisteröintiin johtaneissa kokeissa diabeettiset urosrotat olivat Hannovers-rotuisia. Tämä rotujen välinen ero tulee pitää mielessä tuloksia tarkasteltaessa,

vaikkei sillä todennäköisesti ole kovinkaan suurta merkitystä tulosten keskinäisen vertailun validiteetin kannalta.

Diabetes mellitus indusoitiin rottiin streptotsotosiini-injektiolla hännän tyveen annoksella 60 mg/kg injektioilavuuden ollessa 1 ml/kg. Streptotsotosiini liuotettiin sitraattipuskuriin ja kontrollirotille injektioitiin ainoastaan tätä sitraattipuskuria. Noin viikon kuluttua indusoinnista diabeettisiksi indusoitujen rottien veren sokeripitoisuus ylitti kynnyksarvona pidetyn 14,3 mmol/l. Tämän arvon ylittyessä katsottiin diabeteksen kehittyneen riittävälle tasolle. Näissä koe-eläinten valmistelumenetelmissä mukailtiin Pertovaaran ja kumppanien vuonna 2001 julkaistua tutkimusta (Pertovaara & Wei 2001). Streptotsotosiinilla diabeettisiksi indusoiduilla rotilla oli diabeettisen neuropatian kehittyminen todennettu käyttäytymisen tasolla, kosketukseen liittyvänä allodyniana, joka todennettiin mittaamalla vasteen kynnyksarvoa, sekä mekaanisena hyperalgesiana.

#### 3.2.4. Leikkeiden teko

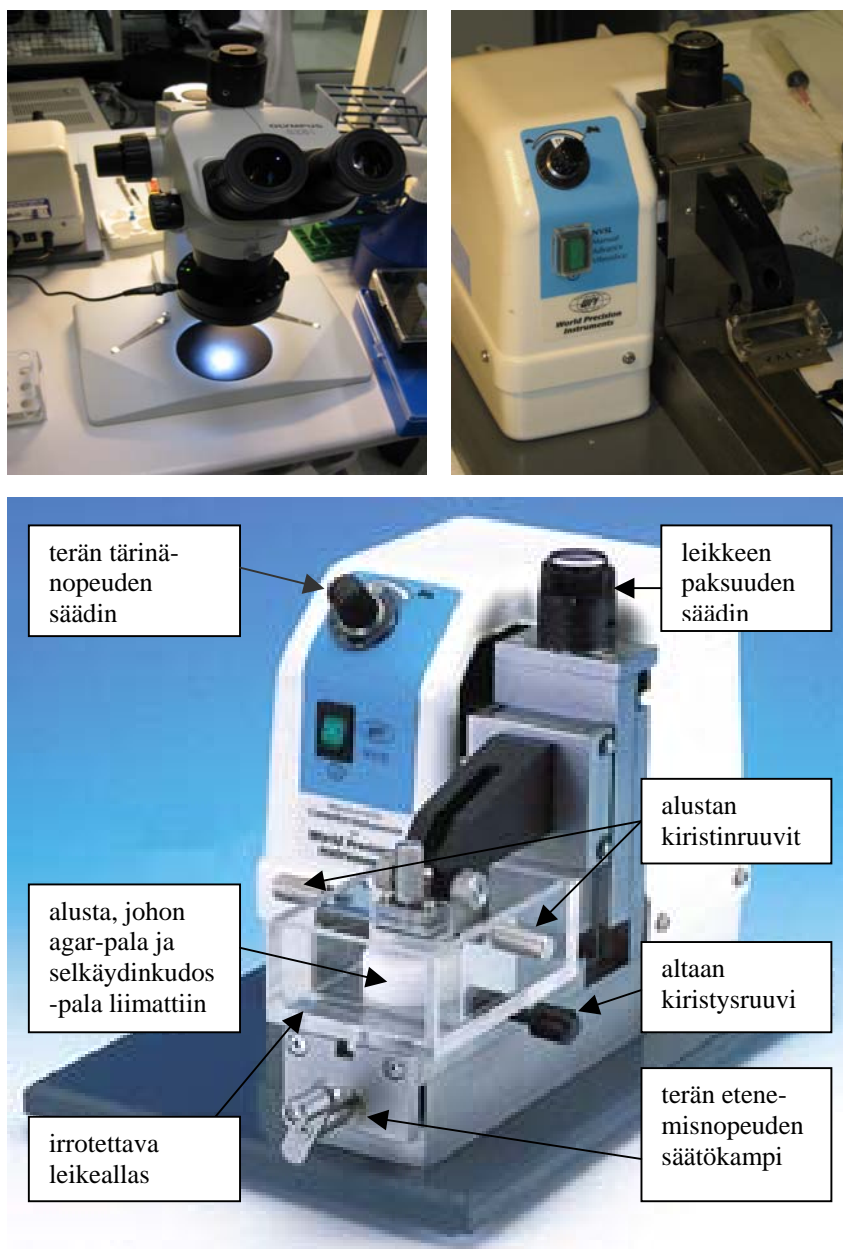
Koe-eläinrotat altistettiin lääketieteelliselle karbogeeni-kaasulle tätä tarkoitusta varten kehitetyssä laatikossa, jossa oli lasikansi. Koe-eläin lopetettiin riittäväksi havaitulla kaasuanoksella. Tämän jälkeen eläin dissekoitiin teräviä saksia käyttämällä siten, että mahdollisimman pitkiä ehjiä selkäydinpätkiä saatiin siirrettyä leikeliuosta sisältävään dekantterilasiiin. Päädyttiin menettelyyn, jossa ensin leikattiin pitkittäissuuntaisesti rotan selän keskilinjaa pitkin viilto ja tämän jälkeen paljastunut selkäranka leikattiin erilleen muusta kudoksesta molemmin puolin. Seuraavaksi siirryttiin käyttämään hyvin pieniä ja teräväkärkisiä saksia, joilla selkäydinkudos saatiin erotettua selkärangan sisältä. Tämä oli tarkkaa työtä, sillä selkäydinkudoksen pintaa ei haluttu vaurioittaa terävillä saksen kärjillä ja kudos haluttiin tästä huolimatta irrottaa mahdollisimman nopeasti, jotta happivaje jäisi mahdollisimman lyhyeksi. Normaalisti otettiin kolme tai neljä tiiviskudoksista noin puolen senttimetrin mittaista selkäydinkudospalaa, jotka laitettiin leikeliuosta sisältävässä dekantterilasissa jääpaloilla täytettyyn kylmälaukkuun.

Selkäydinpätkät käsiteltiin kuvassa 3.10. näkyvän valomikroskoopin alla siten, että niistä poistettiin pehmeäkalvo ja lukinkalvo leikkaamalla erittäin pienillä ja terävillä saksilla

jääpaloilla täytetyn petrimaljan päällä leikeliuksella kostutetun imupaperin päälle asetettua selkäydinkudospätkää mikroskoopin kautta operaatiota seuraten. Tässä apuna käytettiin myös teräväkärkisiä pinsettejä. Tämän tarkkaa käden- ja silmän yhteispeliä vaativan toimenpiteen huolellinen suorittaminen oli todella keskeistä, sillä mikäli kalvot jätettiin selkäydinkudoksen ympärille, ne tarttuivat leikkurin terään leikkeiden valmistustilanteessa, jolloin tasapaksujen, siistien ja säännöllisen muotoisten leikkeiden teko estyi. Kalvoa ei tarvinnut jäädä kuin pieni kaistale kudospreparaatin pintaan, kun se jo vaikeutti huomattavasti siistien leikkeiden työstämistä.

Kun kalvot oli poistettu, selkäydinpätkä leikattiin terävällä partakoneen terällä vieläkin matalammaksi. Usein noin puolen senttimetrin pituinen pätkä vielä puolitettiin. Liian korkea selkäydinpala oli hankala tukea leikkurissa niin, ettei se olisi liikkunut terän tärinän vaikutuksesta. Leikepala liimattiin kuvassa 3.10. näkyvän leikkurin altaan pohjalla olevaan pyöreään metallialustaan pystysuunnassa, niin että leikkauspintana oli selkäytimen horisontaalisuuntainen poikkileikkauspinta. Leikkeet olivat siis konfiguraatioltaan transversaalileikkeitä. Ennen selkäydinpreparaatin liimaamista Super attack -liimalla, liimattiin leikkurin altaan alustaan hieman kudospreparaattia leveämpi agar-geelipala, jonka tarkoitus oli tukea selkäydinnäytettä leikkurin käytön aikana. Selkäydinleikepreparaatti siirrettiinkin leikkurin alustaan varovasti aivan kiinni etualalla olevaan agar-blokkiin. Välittömästi liimaamisen jälkeen leikkurin allas täytettiin hieman selkäydinnäytteen yläreunaa korkeammalle leikeliuksella, joka otettiin käyttöön suoraan jääkaappikylmänä. Leikkurissa käytettiin terän vibraation arvona parametria 11, joka oli juuri sopiva tämäntyyppisiin leikkeisiin. Leikkeiden paksuus säädettiin manuaalisesti. Päädyttiin työstämään 400 µm paksuja leikkeitä. Tämä paksuus oli käyttökelpoinen halutun noin kolmannen solukerroksen saavuttamiseen ja visualisointiin mittatilanteessa. Tässä paksuudessa laitteiston visualisointiominaisuudet olivat juuri optimaaliset. Paksummassa leikkeessä näkyvyys olisi ollut heikompi. Tällä paksuudella saatiin myös varmasti riittävä määrä kauniita leikkeitä. Leikkeitä tehtiin useimmiten jopa neljästi erikseen leikkuria varten käsitellystä ja liimatusta selkäydinleikepreparaattipalasta, jotta leikkeet varmasti riittäisivät mittaustilanteessa ja jotta saatiin pidettyä kerralla työstettävän selkäydinkudospalan korkeus riittävän matalana sen riittävän paikallaanpysymisen

takaamiseksi leikkuria käytettäessä. Terän eteneminen selkäydinkudospalan läpi oli käsisäätöistä. Leikkurin etualalla näkyy kuvan 3.10. oikeanpuoleisimmassa kuvassa kambi, jota hitaasti ja tasaisesti pyörittäen saatiin terän etenemisnopeus sen koko ajan tärhistessä säädettyä sopivaksi. Nopeutta säädettiin sen mukaan, miten leike lähti irtoamaan terän liikkeessä preparaatin yli. Tämänkin laitteen hallinta saavutettiin nopeasti kokeilun kautta.

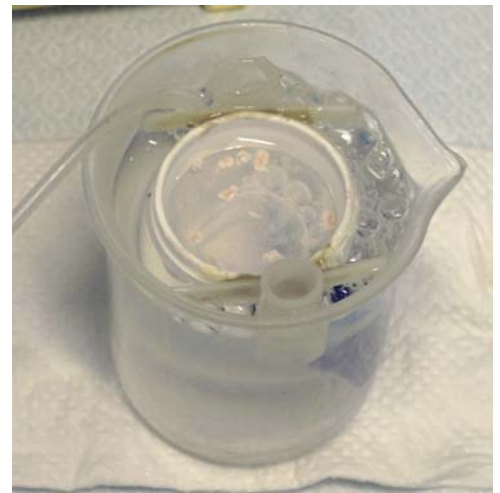


**Kuva 3.10.** Ylhäällä vasemmalla nähdään selkäydinkudospätkän kalvojen poistossa ja preparaatin pilkkomisessa pienempiin paloihin hyödynnetty valomikroskooppi, joka oli malliltaan Olympus SZ61. Ylhäällä oikealla näkyy tutkimuksessa käytetty leikkuri World precision instrumentsin NVSL manual

**advance vibroslice, jossa on Valet-merkkinen partaterä kiinni. Alimmainen kuva on laitevalmistajan kotisivuilta. Siinä näkyy myös allasosa, joka ei keskimmäisessä kuvassa ole vielä paikallaan (World Precision Instruments, www-sivu).**

Leikkurin alusta oli irrotettava, mistä olikin hyötyä selkäydinpalan vaihtotilanteessa, jolloin leikeliuksella täytetty allas saatiin alustaan liimaamisen ajaksi jääpalojen päälle. Allas kokonaisuudessaan, siis alustan kanssa, säilytettiin mittauspäivien välillä pakastimessa.

Leikkurilla valmistetut 400 µm paksuiset leikkeet siirrettiin imupipetillä, josta oli tehty tylppäkärkinen leikkaamalla kärjen kaventuva osa pois, inkubaatidekantteriin, jossa oli aivan päivän alusta asti kuplitettu ekstrasellulaariliuosta. Tässä siirtämisessä käytettiin apuna kapeata sivellintä, jolla voitiin ohjata leikkurin altaan pohjalla oleva selkäydinpreparaatista irti leikattu leike pipettiin. Leikkeet koetettiin asettaa inkubaatiokammiona toimivaan dekantteriin niin, että kukin leikkeistä oli verkon päällä muista leikkeistä erillään eli kosketuksissa kuplitettuun ekstrasellulaariliuokseen sekä päältä että alapuolelta. Kuvassa 3.11. näkyy eräänä koepäivänä tehtyjä leikkeitä inkubaatiokammiona toimineessa dekantterissaan. Leikkeiden annettiin aina toipua tunti inkubaatiokammiossa ennen kuin leike voitiin siirtää mittausalustaan ja aloittaa mittaukset. Leikkeet säilyivät hyvinä koko mittauspäivän tässä inkubaatiokammiossa jatkuvassa happikuplituksessa olevassa ekstrasellulaariliuoksessa. Myöhään illallakin ne olivat vielä mittauskelpoisia ja SG:n alueelta löytyi terveen näköisiä ja toimivia neuroneita.



**Kuva 3.11. Inkubaatiokammio, jossa näkyy yksittäisiä 400 µm paksuisia transversaali leikkeitä**

Tällaisen tärinämikrotomileikkurin käytöllä on kiistattomat etunsa suhteessa etenkin aiemmin leikkeiden teossa hyödynnettyyn kudosleikkuriin. Leikkeen leikkauspinta on huomattavasti siistimpi kuin perinteistä kudosleikkuria käyttämällä saatu. Salaisuus piilee laitteen korkea-amplitudisessa tärinässä, hitaaksi ja tasaiseksi manuaalisesti säädetyssä etenemisnopeudessa ja kylmänä pidetyssä leikeluoksessa, joka ympäröi koko ajan leikkurissa olevaa kudosta. Solut näissä tärinävibratomileikkurilla valmistetuissa leikkeissä ovat myös silminnähten terveempiä. In vitro elektrofysiologisissa tutkimuksissa onkin suurelta osin siirrytty käyttämään näitä tärinään perustuvia leikkureita (Walz 2002). Leikkurin terä vaihdettiin uuteen noin viikon välein. Terä saatiin pidettyä siistinä pyyhkimällä se jokaisen käyttökerran jälkeen etanolilla ja säilyttämällä se erillään muista leikkeiden teossa käytetyistä metalli-instrumenteista.

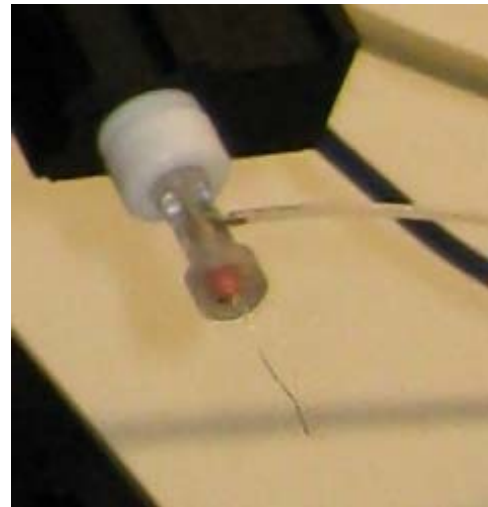
### 3.2.5. Muut esivalmistelut

Jokapäiväisiin mittauksia edeltäviin esivalmisteluihin kuului virtauksen nopeuden säätäminen. Tähän voitiin vaikuttaa asettamalla imuri sopivalle korkeudelle suhteessa mittausaltaan nestepinnan korkeuteen ja asettamalla perfuusioletkun yläpäässä oleva venttiili sopivaan asentoon, jotta solunulkoista liuosta ei virtaisi liian nopeasti tai toisaalta liian hitaasti. Liuosnopeus säädettiin silmämääräisesti ja kokemusperäisesti siten, että mittausaltaaseen menevää ekstrasellulaariliuoksen tuloletkua pidettiin ilmassa mittausaltaan päällä samalla säätämällä venttiilin asentoa. Näin menetellen oli helppo havaita, millaisella nopeudella solunulkoisen liuoksen nestepisararat tuloletkun kärjestä tippuivat. Lämmitinlaite laitettiin luonnollisesti päälle vasta kun virtaus oli kunnossa, etteivät mittausaltaan lämpövastukset olisi polttaneet mittausaltaan ohutta lasipohjaa lämmitettävän liuoksen vielä puuttuessa. Muut laitteiston elektroniset osat oli käynnistetty jo ihan aamusta ennen leikkeidentekoa vaiheessa, jossa kuplitettavat liuokset laitettiin kuplitukseen.

Tarpeen mukaan suoritettavia esivalmisteluja olivat esimerkiksi mittaelektrodin kloridointi ja agar-geelin valmistaminen. Mittauselektronin kloridoinnin tarpeeseen vaikutti toisaalta mittapipettien vaihtamisen määrä, mitä enemmän vaihtoja sitä enemmän pinnoitus kuluu, ja toisaalta myös se, kuinka hyvin lasipipetin tylppä pää oli pyörästetty kaasuliekillä, ettei sen terävä leikkuupinta naarmuttanut elektrodin päällystettä pois. Rungas sähköisten impulssien



käyttö solun rei'ittämistarkoituksessa kulutti myös osaltaan kloridointia. Kloridointitarkoituksessa käytettiin Huco Sachs elektronikin automaattista kloridointilaitetta mallia D-79232. Kuvassa 3.12. näkyy vastaava automaattinen kloridointilaitte. Elektrolyyttinen kloridaatio on yksinkertainen tapa kloridoida Ag/AgCl-elektrodi. Laite päällystää hopealangan pinnan AgCl-fimillä, joka on veteen liukenematon. Elektrolyyttiliuoksena laitteessa voidaan käyttää mitä tahansa suolaliuosta. Tässä tarkoituksessa käytettiinkin NaCl:a sisältävää solunulkoista liuosta. Kloridointi tällä laitteella oli suoraviivaista ja muutaman toiston jälkeen saattoi hyvinkin arvioida ajan, joka kului sopivanpaksuisen pinnoitteen syntymiseen. Virransyötön nopeudeksi laitteessa valittiin low. Autokloridointilaitte toimii vakioisena virtalähteenä. Kloridoinnin alku ja loppu voidaan säätää manuaalisesti. Vastaelektrodina (katodina) käytetään hiililasikeraamista astiaa. Tällä materiaalilla on suuri johtavuus ja se on erittäin pysyvä fysiologisesti sekä vastustuskykyinen korroosiolle ja hapettumiselle. AgCl-filmiin ei näin ollen tapahdu kontaminaatioita vapaiden metalli-ionien vaikutuksesta, toisin kuin olisi tilanne esimerkiksi ruostumattomasta teräksestä valmistettua katodia käytettäessä (Harvard Bioscience, [www-sivu](http://www.sivu)). Kuvassa X. sopivasti kloridoitu mittauksessa käytetty elektrodi, joka on jo kiinni pipetinpitimessä. Kuvaustilanteessa sen ympäriltä puuttuu vielä intrasellulaariliuoksella välittömästi pipetinpitimeen asettamista ennen täytetty borosilikaattilasipipetti.



**Kuva 3.12.** Vasemmanpuoleisessa kuvassa näkyy vastaaventyyppinen automaattinen kloridointilaitte kuin mittauksissa hyödynnetty sekä osina että koottuna (Harvard Bioscience, [www-sivu](http://www.sivu)). Oikeanpuoleisessa kuvassa koetta varten kloridoitu elektrodi, joka on paikallaan pipetinpitimessä.

Leikkurissa käytettiin agar-geelipalaa tukemassa selkäydinleikekudospalaa, jotta se pysyisi leikkurin terän liikkeessä paikallaan ja leikkeistä tulisi näin ollen helpommin tasapaksuisia ja kokonaisia. Agarin valmistuksessa käytettiin 3 grammaa agaria 100 ml solunulkoistanestettä kohti. Tämä sekoitettiin hyvin ja seosta lämmitettiin mikrossa, minkä jälkeen se jätettiin jääkaappiin jähmettymään. Geeli oli sopivan jähmettynyttä käytettäväksi seuraavana päivänä.

Kun kaikki oli valmista mittauksen aloittamista varten, siirrettiin leike mittauskammioon, jossa siis perfuusio oli jo säädetty sopivalle tasolle. Leike tuettiin altaan pohjalle leikepitimellä, joka on valmistettu hopealankasilmukasta, jonka sisällä kulkevat tasaväliset nylonlangat. Nylonlankojen liian tieheä väli leikepitimessä olisi ollut huono, sillä nylonlangat peittävät tällöin turhan suuren osan leikkeen pinta-alasta. Näin ollen päädyttiin käyttämään leikepidintä, jossa nylonlangat olivat suhteellisen harvassa. Leikepidin kannattaa kostuttaa pinsettien avulla mittauskammion ekstrasellulaarinsteessä ennen sen asettamista leikkeen päälle, ettei se jää ikävästi kellumaan leikkeen kanssa virtauksen mukana, vaan asettuu stabiilisti paikalleen altaan pohjalle. Leikkeen asettaminen mittausaltaan pohjalle on hieman haastavaa, sillä mittausaltaassa on koko ajan päällä virtaus. Imurin korkeutta voikin hetkeksi nostaa leikkeen asettamisen ajaksi, jottei virtausnopeus olisi aivan niin suuri. Tässä vaiheessa tulee toimia nopeasti, ettei liuosta ehdi kertyä mittausaltaaseen liikaa leikkeen ja leikepitimen asettamisen aikana, jolloin vaarana on vesivahinko, mikäli neste ehtii tulla mittausaltaan reunojen yli. Leike tulisi pyrkiä saamaan mahdollisimman keskelle mittausallasta ja luonnollisesti tulisi välttää sen taittumista reunoilta. Myös leikkeen asettaminen samoin päin jokaisessa mittauksilanteessa olisi toivottavaa mittauksen kohdealueen helpomman löytämisen ja saavuttamisen kannalta. Tässä vaiheessa on riskinä, että leike saatetaan menettää. Tämä on yksi syistä, joiden takia leikkeitä on hyvä valmistaa useita.

### 3.3. Mittausten suorittaminen

Tässä luvussa esitellään selkäydinleike-patch-clamp-mittauksissa käytetyt protokollat. Ne kuvataan yksityiskohtaisesti juuri siinä muodossa, kuin ne tässä diplomityössä suoritetuissa kokeissa toimeenpantiin.

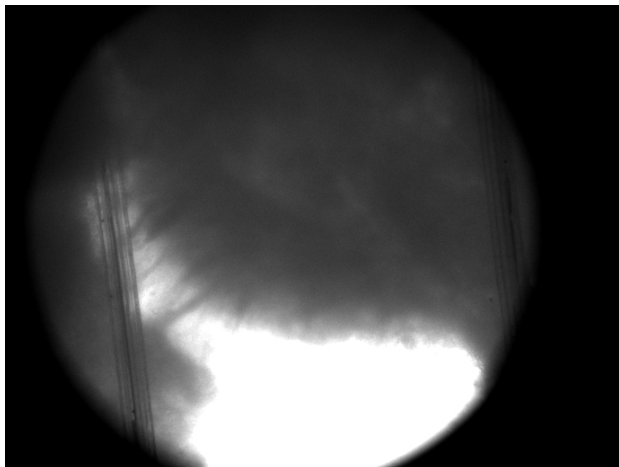
### 3.3.1. Mittauksia pohjustava manuaali-patch-clamp-kokeilu

Ennen leike-patch-clamp-laitteiston pystyttämistä ja mittausten aloittamista pystytetyllä leike-patch-clamp-laitteistolla kokeiltiin gigaliitosten tekoa ja kokosolumittaustilanteeseen siirtymistä manuaali-patch-clamp-laitteistolla. Tämä patch-clamp-laitteisto on ollut laboratoriossa jo pitkään käytössä. Tällä laitteistolla tutustuttiin näiden perus-patch-clamp-mittaustoimintoihin kohdistettuna lasilevyille kasvatettuihin soluihin. Tämän kokeilun tarkoituksena oli saada tuntuma patch-clamp-laitteiston käyttämiseen ja toimintaan yksinkertaisessa tapauksessa. Esimerkiksi erilaisten mittausten vaatimien kompensatioiden tekeminen jää jossain määrin abstrakstiksi, kun ne suoritetaan leike-patch-clamp-laitteistoon kuuluvan ohjelmiston kautta napin painalluksina. Manuaali-patch-clamp-laitteistossa tällaiset toimenpiteet suoritetaan käsisääteisesti patch-clamp-vahvistimen ohjauspaneelin säädinten kautta. Manuaali-patch-clampissä käytetty koeasetelma ei ollut yhtä haastava kuin leikeasetelma, sillä lasilevyille kasvatetut näytteet, eivät sisällä samassa määrin soluja ja niitä ympäröivää kudospohjaa kuin leike. Yksittäisten solujen tavoittaminen mittapipetillä sekä visualisointi suoraan mikroskoopin avulla on verrattain yksinkertaista. Näitä soluja varten toimivat liuokset ja pipettien parametrit oli myös optimoitu entuudestaan, joten voitiin suoraan siirtyä kokeilemaan gigaliitoksen tekemistä ja kokosolumittaustilanteeseen siirtymistä. Ensikosketuksen luominen patch-clamp-mittausmenetelmään manuaali-patch-clamp-laitteiston avulla oli opettavaista ja osoitti konkreettisesti, millaisia toimenpiteitä pystytettävällä leike-patch-clamp-laitteistolla oli tarkoituksena tehdä koeasetelmaan liittyvän vaikeustason noustessa monessa suhteessa.

### 3.3.2. Kokosolumittauskonfiguraation protokolla

Aivan aluksi etsittiin aina objektiivin 0,25-kertaisella suurennoksella oikea kohdealue leikkeestä. Substantia gelatinosa näyttäytyi leikkeessä osittain läpinäkyvänä kaarevana alueena. Alue oli lähes aina helposti tunnistettavissa liikuteltaessa mittausaltaan sisältävää mikroskoopin tasoa niin, että kameran kuvasta tietokoneen näytöltä voitiin koko ajan tarkastella leikkeen reunoja myötäilevää etenemistä. Kuvassa 3.13. näkyy yhdessä mittaustilanteessa paikallistettu kohdealue. Kun oikea alue löydettiin, vaihdettiin objektiivin suurennos nelinkertaiseen. Tällä suurennoksella saatiin yksittäiset neuronit

hyvin näkyviin. Tässä vaiheessa kameran ja mikroskoopin parametreja jouduttiin usein optimoimaan. Kun sopiva solu löydettiin, haettiin se kuvaan keskelle ja siirryttiin takaisin 0,25-kertaiseen suurennokseen.

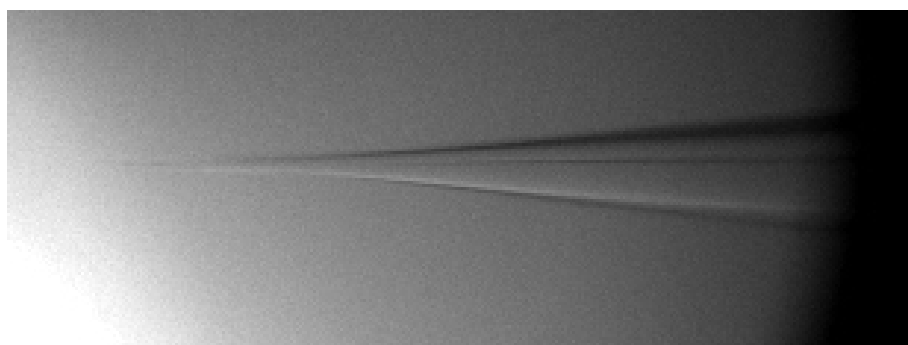


**Kuva 3.13. Substantia gelatinosa alue selkäydinleikkeessä. Kuvassa näkyy myös leikepitimen nylonlangat, joista yksi menee myös substantia gelatinosa poikki.**

Tässä vaiheessa täytettiin pipetti, minkä jälkeen se liitettiin pipetinpitimeen, joka puolestaan ruuvattiin kiinni vahvistimen päätasoon (head stage). Ennen kuin pipetti voitiin laskea nesteeseen, täytyi siihen lisätä takapaine puhaltamalla U-putken ja siihen liittyvän imuletkun avulla. U-putkivälitteisen paineensäädön periaatteet on kuvattu laitteiston esittelyn yhteydessä. Takapaineella pyrittiin vähentämään ylimääräisen aineksen tarttumista pipetin kärkeen. Erityisesti ilma-nesterajapinnalla on taipumus kerätä likaa, ja onkin tärkeätä, että pipetissä on ylitettäessä tämä rajapinta riittävä takapaine. Takapaine poistettiin vasta sitten, kun pipetti oli aivan kiinni kohdesolun kalvossa ja pipetin kärjen ja solukalvon välillä oli sopivankokoinen kuoppa (dimple). Mikäli kaikki sujui suunnitelmien mukaan, solukalvon ja pipetin välille muodostui tässä vaiheessa gigaliitos. Mitä korkeampi liitoksen vastus on, sitä paremmin pipetinalainen membraanikohta on sähköisesti eristetty. Toisekseen korkea liitoksen resistanssi minimoi myös mittauksen taustahäiriötasoa (Ogden 1994). Useimmiten parhaat eli kestävimät ja erityisen korkeavastuksiset liitokset syntyivät verrattain nopeasti, ja jos liitoksen vastuksen kohoamista gigaohmitasolle jouduttiin odottamaan muutamaa sekuntia pidempään, se oli usein verrattain matalavastuksinen ja mekaanisesti epästabiilimpi. Joskus gigaliitoksen kehittyminen saattoi

kestää jopa muutamia minutteja, mutta tämä ei siis ollut suotavaa. Mittauksissa aikaansaadut gigaliitokset vaihtelivat vastukseltaan gigaohmista parhaimmillaan yhdeksään gigaohmiin.

Ennen kuin gigaliitosta päästiin muodostamaan tuli pipetti ohjata valitulle alueelle. Tässä harjaannuttiin onnistumaan hyvinkin nopeasti. Kuvassa 3.14. näkyy suurennoksella 0,25 pipetin kärki. Kun pipetin kärki tällä suurennoksella löydettiin keskelle, voitiin vaihtaa jälleen nelinkertaiseen suurennokseen ja alkaa hitaasti laskea pipettiä kohti kohdesolua, mikäli kärki näytti hyvältä ja puhtaalta ja sen leikkauspinta tasaiselta. Tässä vaiheessa edettiin aluksi mikromanipulaattorin mekaanisessa osassa olevan hienosäätö-/karkeasäätökytkimen ollessa karkea-asetuksella. Aina ensin fokuoitiin pipetin alapuolelle ja vasta sitten laskettiin pipetti tälle fokustasolle. Näin voitiin varmistaa, ettei pipetillä edetty liian alas suhteessa valittuun soluun. Laskeuduttaessa tällä tavalla mittausaltaassa olevassa nesteessä alkoivat solut pikkuhiljaa tulla näkyviin eli nesteessä oli tässä vaiheessa edetty pipetillä leikkeeseen asti. Tässä vaiheessa vaihdettiin mikromanipulaattorin asetukset hienosäätöasentoon. Näin oli mahdollista jatkaa kohdesolun lähestymistä erittäin hienovaraisesti, mikä oli merkittävä etu oikeankokoisen solukalvon ja pipetin kärjen välisen painauman muodostamisessa, josta on kerrottu tarkemmin kirjallisuusosassa.



**Kuva 3.14. Toimivan filamentillisen lasipipetin kärki.**

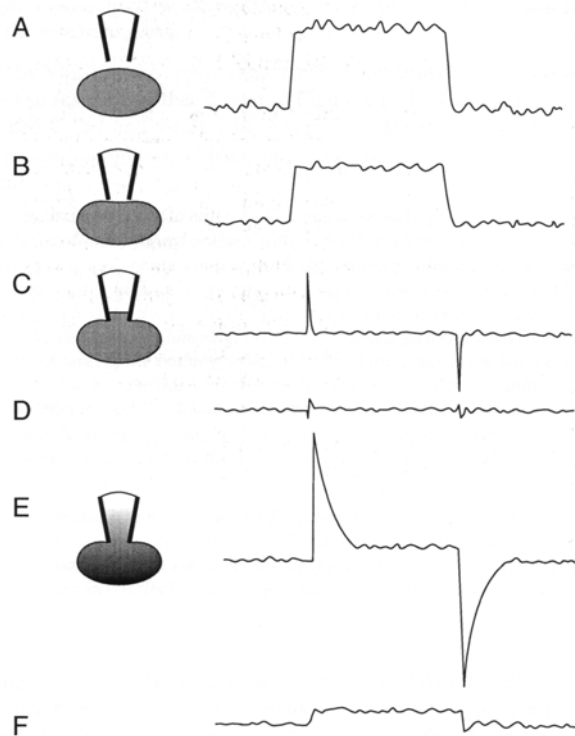
Tutkimuskohteeksi valittu solu pyrittiin aina löytämään noin kolmannen neuronikerroksen tasolta leikkeen pinnasta laskettuna. Tämä osoittautui kokemuksen karttuessa hyväksi syvyydeksi, sillä tässä syvyydessä solut olivat jo hyväkuntoisia, kun taas liian pinnassa ne olivat kuolleita ja usein paisuneessa muodossa, jossa soluseinät esittäytyivät paksuina ja

solujen muoto oli turvonneen pallomainen. Toisaalta tämä kerros ei ollut myöskään liian syvällä. Se oli siis vielä kohtuullisen helposti saavutettavissa pipetillä ilman että jouduttiin penetroimaan kovin syvälle leikkeessä, jolloin on kasvava riski, että pipetin kärkeen tulee epätoivottavaa ainesta, mikä lähes poikkeuksetta estää gigaliitoksen tekemisen. Solun valinnalla tästä kerroksesta saatiin siis minimoitua kontakti mittaukseen kelpaamattomien solujen ja soluväliaineiden kanssa ja pitämään näin pipetti varmemmin puhtaana ja toimintakykyisenä. Kun oltiin jo lähellä solua, fokuoitiin vielä soluun ja merkittiin näytön kuvaan piirtotyökalulla solun rajat. Näin tehtäessä saatettiin solua ylempänä olevaan pipetin kärkeen fokuoitaessa nähdä, että pipetti varmasti oli oikeassa kohdassa suhteessa kohdesoluun, mielellään mahdollisimman keskellä neuronin, jonka kalvolle se sitten hitaasti ja tasaisesti laskettiin.

Erityishaasteena solua lähestyttäessä oli pipetinpitimen ja siten mittapipetin oikeanlainen solun lähestymisen kulma. Ilman leikettä kulman sai säädettyä kutakuinkin oikeaksi, mikäli pyrki asettamaan leikkeen aina mahdollisimman keskelle mittausallasta samassa konfiguraatiossa. Silti mittaustilanteessa leikkeen ollessa hieman eri kohdassa mittausaltaan pohjassa tai leikkeen ollessa hieman erikokoinen, saattoi kulma osoittautua vääräksi ja pipetin kärjen vieminen valitun solun solukalvolle asti estyä. Leikkeet saattoivat olla halkaisijaltaan hieman erisuuruisia, sillä selkäydinkudos oli eri selkäytimen korkeuksilla hieman eri paksuista. Leikkeiden paksuus oli kuitenkin aina vakio, leikkurin käyttötilanteessa säädetty 400 µm. Mikäli kulma osoittautui vääräksi soluun pipetillä laskeuduttaessa, ei auttanut muu kuin nostaa pipetti pois leikkeestä ja liuoksesta ja koettaa säätää kulma paremmaksi ennen pipetin vaihtamista uuteen.

Mittaustilanteeseen edetessä pipetin ja ympäristön välisten sähköisten suhteiden muutokset aiheuttavat herkästi mittatulosten vääristymää. Muutosten vaikutuksia pyritään eri vaiheissa kompensoimaan Multclamp 700B -ohjelman avulla. Kun pipetti oli laskettu mittaliuokseen, suoritettiin pipetin kärjen offset-kompensaatio. Tässä vaiheessa tuli olla valittuna ohjelmiston IC- eli virransyöttötila. Offset-kompensaatioissa kompensoidaan pipetin sisä- ja ulkopuolen liuosten ionikonsentraatio- ja mobiliteettierojen muodostaman liitospotentiaalini aiheuttama virta. Liitospotentiaaliksi kutsutaan nesteiden liitoskohdan – tässä pipetin kärjen

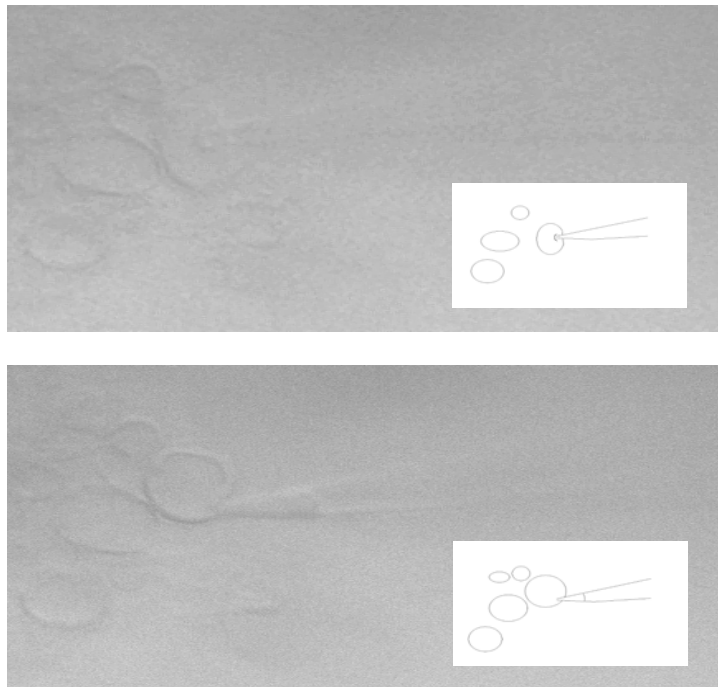
aikon – yli olevaa potentiaaliero. Kompensoitava potentiaali on luokkaa 2-12 mV (Ogden 1994). Liitoksen muodostuessa pipetin ja solukalvon välille ja yhteyden soluun auetessa, tulee tehty offset-kompensaatio jälleen huomioida oikean nollasson määrittämiseksi. Offset-kompensaation jälkeen, pipetin kärjen ollessa liuoksessa, siirryttiin ohjelman VC- eli jännitelukitustilaan, jossa pipetin kärjen vastus mitattiin 10 mV suuruisen testipulssin avulla. Toimivien elektrodien vastus käytetyissä liuoksissa vaihteli välillä 3-12 M $\Omega$ . Tämä ei ollut ongelmallista, sillä myös kohdealueen neuronien koot vaihtelivat suhteessa aivan yhtä paljon. Mittaukseen valitun solun oli hyvä olla ainakin kolminkertainen halkaisijaltaan mittapipetin halkaisijaan nähden. Tämä ei kuitenkaan ollut aivan välttämätön edellytys gigaliitoksen ja kokosolumittaustilanteen aikaansaamiseksi. VC-tilassa oltaessa avattiin Clampex-ohjelmasta membraanitesti-ikkuna. Testipulssin esiintymistaajuus saatiin säädettyä ikkunan valikosta sopivalle tasolle. Patch-clamp-elektrodin resistanssia tuli tarkkailla jatkuvasti, sillä muutosten resistanssissa tulisi kuvata patch-elektrodin ja solukalvon fysiologista suhdetta. Mikäli vastus kasvaa kovasti ennen kohdesolun kalvon saavuttamista, kannattaa yritys lopettaa heti, sillä tässä tapauksessa kärki on ainakin jossain määrin tukkeutunut ja on epätodennäköistä, että saadaan gigaliitos aikaiseksi. Kuvassa 3.15. on esitetty testipulssin muoto kokeen eri vaiheissa. Kun elektrodi oli kiinni solukalvossa, kasvoi membraanitesti-ikkunassa tarkasteltu vastus usein noin kahdella tai kolmella megaohmilla.



Kuva 3.15. Testipulssi tuottaa erilaisia virtavasteita riippuen kokosolu-jännitelukitus-patch-clamp-mittauksen vaiheesta. Vasemmalla on kuvattu patch-elektrodin ja solukalvon fysiologinen suhde kussakin tilanteessa ja oikealla testipulssin muoto näissä tilanteissa. Virranmuutos, jonka testipulssi tuottaa, laskee sitä mukaa kun elektrodin kärjen vastus kasvaa. Niinpä testipulssin virran madaltuminen tarkoittaa lähempää kontaktia pipetin kärjen ja solukalvon välillä. Tilanteessa A elektrodi on juuri solukalvon pinnan yläpuolella, mutta ei vielä suorassa yhteydessä kalvoon. Tässä vaiheessa resistanssi on matala, välillä 1–10 M $\Omega$  ja testipulssin virta on korkea. B-kuvassa elektrodi koskettaa solukalvon pintaa resistanssin noustessa hieman ja testipulssin virran pienentyessä. C-kuvassa gigaliitos on muodostunut hellävaraisen imun seurauksena ja pieni osa solukalvosta on työntynyt pipetin kärjestä sisään. Tässä vaiheessa vastus on korkea, yli gigaohmin luokkaa, ja testipulssin virta on nollassa lukuun ottamatta nopeita (transientteja) heilahduksia, jotka näkyvät kuvassa selvästi. Kuvassa D nämä elektrodikapasitanssin lyhytkestoiset heilahdukset kompensoidaan. Kuvassa E on saatu aikaan solukalvon rei'ittyminen nopealla ja voimakkaalla imupulssilla. Tässä vaiheessa rei'itty pipetinsisäinen solukalvon osa muun solukalvon sekä gigaliitoksen säilyessä intakteina. Resistanssi laskee ja suuret kapasitiiviset piikit näkyvät testipulssin virrassa. Solun sisäosan perfusoituminen pipettiliuksella käynnistyy tässä vaiheessa. Kuvassa F kokosolu-mittaustianteen kapasitiiviset piikit on kompensoitu. Koska vaiheet D ja F ovat puhtaasti sähköisiä säätöjä, solun ja pipetin fysiologista suhdetta havainnollistavat kuvat ovat samat kuin näitä edeltävissä kohdissa C ja E (Jackson 1997).



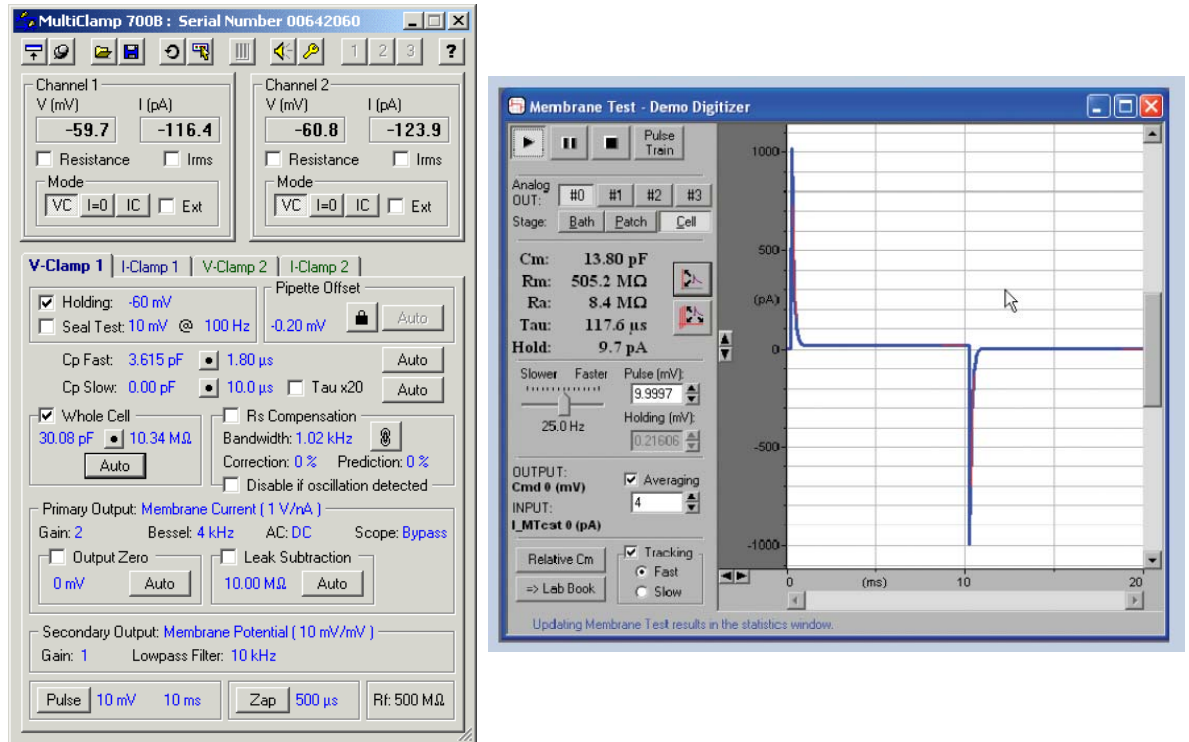
Gigaliitoksen muodostumista voitiin usein helpottaa lisäämällä heti takapaineen poistamisen jälkeen ja samaan aikaan imuun siirtymisen kanssa  $-70$  mV pitopotentiali (holding potential) jännitelukituksen saavuttamiseksi. Jännitelukitus tehdään lähelle solun lepopotentiaalia, jolloin jännitelukituksen aikaansaamiseksi tarvittava virta (holding current) voidaan pitää minimissään (Johnston & Miao-Sin Wu 1995). Kuvassa 3.16. näkyy yhden rekisteröintiin johtaneen koetilanteen vaiheita. Ylemmässä kuvassa solukalvon ja pipetinkärjen välillä on gigaliitoksen aikaansaamiseksi tarvittava oikeankokoinen kuoppa ja samanaikaisesti on myös havaittu membraanitesti-ikkunassa sopivasti kohonnut vastus. Aalemmassa kuvista näkyy tilanne, jossa gigaliitos on muodostunut ja solukalvoa imetty hieman pipetin sisään. Gigaliitoksen muodostuttua kompensoitiin aina testipulssin yhteydessä ilmenevät lyhytkestoiset eli transientit, toisilleen vastakkaissuuntaiset virtapiikit. Virtapiikit muodostuvat elektrodin ja vielä ehjän imualueen solukalvon kapasitanssien latautuessa (testipulssin alussa) ja purkautuessa (testipulssin lopussa). Kompensaation aikana tulee säilyttää pipetin syvyys nestepintaan nähden tarkasti vakiona, sillä nesteen kostuttama pipetin pinta-ala vaikuttaa suoraan pipetin kapasitanssiin (Jackson 1997).



**Kuva 3.16.** IR-DIC-kuvia saman solun eri mittaustilanteista; ylemmässä kuvassa voidaan nähdä kuoppa pipetin kärjen ja solukalvon välillä ja alemmassa kuvassa näiden välille muodostunut gigaliitos.

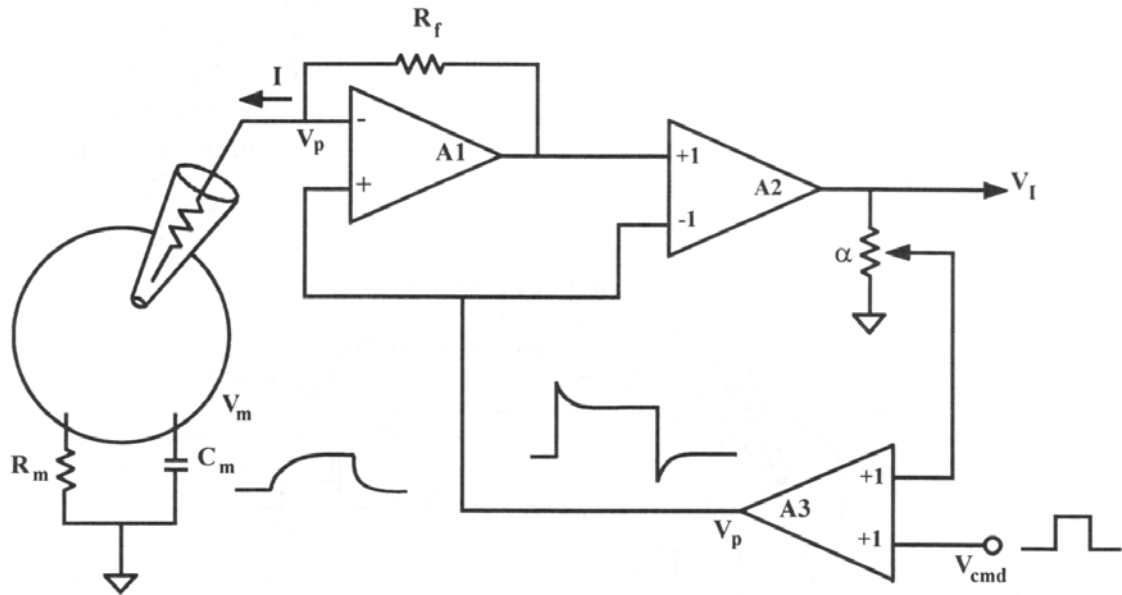
Seuraavaksi siirryttiin kalvon rei'ittämiseen. Tämä toteutettiin joko pelkästään kovalla ja nopealla, pulssittaisella imulla, sähkövirtapulsseilla tai näiden yhdistelmillä. Sähkövirtaa syötettiin useimmiten, mikäli pelkät impulssit eivät riittäneet kalvon rei'ittämiseen. Näitä korkeita sähköpulsseja annettiin Multiclamp 700B -ohjelmavalikon kautta nousevassa sarjassa alkaen aivan lyhytkestoisista pulsseista, 25  $\mu$ s aina 50 ms kestäviin saakka, mikäli tarve vaati. Tutkimussolut olivat hyvin kestäväää tyyppiä, eivätkä solut silminnähdessä kärsineet, vaikka ajoittain jouduttiin käyttämään suhteellisen pitkäkestoisiakin sähköpulsseja soluyhteyden aikaansaamiseksi. Imu oli tärkeää lopettaa heti reiän synnyttyä, sillä tämän jälkeen jatkettu imu rikkoo solun helposti. Jatkuva kevyt imu ja kasvavassa sarjassa annetut virtapulsit osoittautuivat yhdistelmänä parhaaksi tavaksi rei'ittää solukalvo, mikäli kokosolutilanteeseen ei päästy jo heti gigaliitoksen tekovaiheessa eli pelkän imun vaikutuksesta. Mollemanin käytännön ohjeissa parempia patch-clamp-mittauksia varten esitettiin, että mittapipeteillä, joiden vastus on pienempi kuin kolme megaohmia yleensä parhaiten toimii imu, kun taas yli kuuden megaohmin pipeteille puolestaan tehokkaammin toimivat virtapulsit. Rekisteröintiin johtaneissa mittauksissa pipettien vastus vaihteli välillä 2,5–11,9 M $\Omega$ , joten sopivin solukalvon rei'ittämisen strategia tuli valittua mittaustilannekohtaisesti. Todennäköisimmin, tilantennekohtaisista tekijöistä riippumatta, toimi virta- ja impulssien yhdistelmämenetelmä.

Solun kalvon perforoitua testipulssiin ilmaantuu edellisiä transientteja piikkejä selkeästi suuremmat kapasitiiviset piikit. Suuret piikit syntyvät testipulssien ladatessa patch-alueen solukalvon sijasta koko solun sisuksen. Ohjelmassa siirryttiin membraanivastuksen testiikkunassa bath-tilasta cell-tilaan solun rei'ittymisen jälkeen. Tässä tilassa pystytään edelleen seuraamaan membraanin vastusta  $R_m$  ja myös soluuntulovastusta  $R_a$  (access resistance). Tässä vaiheessa suoritettiin kokosolukompensaatio nollaamalla testipulssin aikaansaamat suuret kapasitiiviset virtapiikit. Kuvassa 3.17. vasemmalla näkyy Multiclamp 700B -ohjelman valikko ja oikealla kuva membraanitesti-ikkunasta kokosolutilassa.



**Kuva 3.17.** Vasemmalla vahvistimen komentoikkuna ja oikealla membraanitesti-ikkuna esimerkkitulosluokkonfiguraatiossa ennen kapasitiivisten piikkien kompensointia (Molecular Devices, www-sivu).

Jotta päästiin riittävän matalaan tulovastukseen, jouduttiin toteuttamaan sarjaresistanssin kompensointi. Sarjaresistanssin kompensointi toteutettiin lisäämällä jännitehäviötä kompensoiva, alkuperäistä signaalia täydentävä signaali. Ongelmia syntyy kompensointiprosentin kasvaessa; mittalaitteiston sähköinen piiri lähestyy saturaatiota ja piirin stabiliteetti järkkyy, piirin muuttuessa lähellä 100% kompensointia oskillaatoriseksi. Käytännössä oskillaation raja on huomattavasti matalammilla prosentiosuuksilla pipetin ja solukalvon epäideaalisuuksien johdosta. Elektroniikan saturaation ongelmallisuus voitaisiin teoriassa välttää käyttämällä korkeajännitevahvistimia (+/- 120V), mutta vastaavien vahvistimien suurempi melu rajoittaa niiden käyttöä. Kuvassa 3.18. esitetään esimerkki sarjaresistanssin kompensointiosta positiivisella takaisinkytkennällä (Sherman-Gold 1993).



**Kuva 3.18.** Sarjaresistanssikompensointin mekanismi. Kuvassa yksittäistä pipettiä käyttämällä muodostetaan solun jännityslukitus. Vahvistin A1 toimii virta/jännite-muuntimena ja vahvistin A2 poimii pipetin potentiaalin  $V_p$  luodakseen antovirran  $V_I$ . Osa  $V_I$ :stä ( $\alpha$ ) summautuu  $V_p$ : hallintaan käytettävän komento-potentiaalin  $V_{cmd}$  kanssa. Tämä aikaansaa hetkellisen ja pitkäkestoisien  $V_p$  kasvun verrattuna  $V_{cmd}$ :hen. Täten solukalvo varautuu nopeammin ja jännitehäviö elektrodin resistanssissa kompensoituu sekä kaistan leveys kasvaa (Sherman-Gold 1993).

Sarjaresistanssin kompensoinnin prosentuaalinen suuruus säädettiin mahdollisimman korkeaksi niissä rajoissa, kuin oli mahdollista ilman, että systeemi alkoi oskilloida. Oskilloidessaan systeemi oli vaarassa romahtaa eli ohjelman varoittaessa oskilloidista tuli sarjaresistanssin  $R_S$ -kompensaatiota välittömästi pienentää. Työssä asetimme noin 40 M $\Omega$  raja-arvon ilman sarjaresistanssin kompensointi arvoiksi, jonka alittuessa voitiin aloittaa varsinainen rekisteröinti. Rekisteröinti suoritettiin gap free -koe-protokollalla. Tässä tilassa yksinkertaisesti digitoidaan ja tallennetaan suuri määrä tietoa passiivisesti. Mittauksissa yksi rekisteröinti saattoi jakaantua useampaan tiedostoon, sillä välillä rekisteröinti oli keskeytettävä, kun käytiin tarkistamassa membraanivastuksen testi-ikkunassa sisääntulovastuksen ja membraanivastuksen riittävä taso mittauksen jatkamiseksi. Rekisteröitäessä alipäästösuodatinta säädettiin 1 kHz taajuudelle, jolloin voitiin ainakin olla varmoja, ettei mitään oleellista mittaustiedosta suodateta pois ja signaalivahvistusta kasvatettiin mittaussignaalista riippuen sopivaan arvoon.

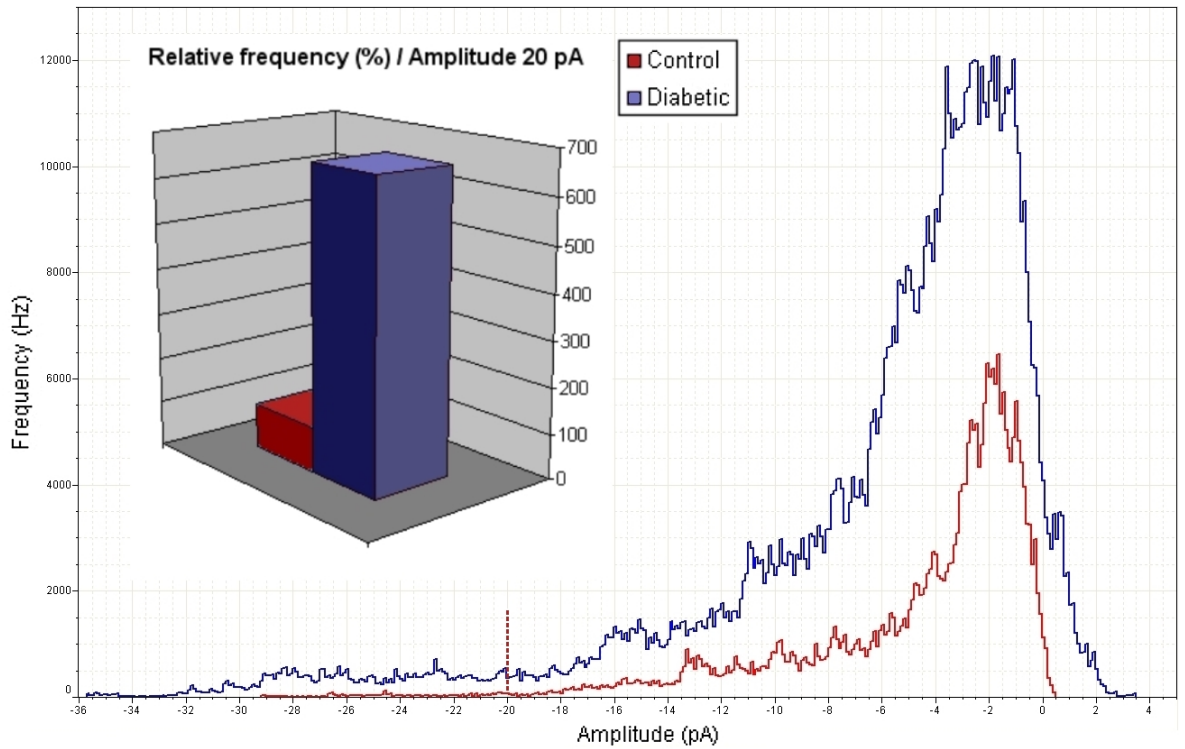
### 3.3.3. Perforaatio-patch-clamp-konfiguraation protokolla

Tämä mittausprotokolla eroaa edellisestä mittapipetin täytössä, joka on jo kuvattu aiemmin sekä kokeen kestossa. Kun gigaliitos on luotu voi kulua pitkäkin aika ennen kuin amfoterisiini-B on perforoinut solukalvon, jolloin päästään kokosolutilanteeseen. Kun läpimurto tapahtui ja solukalvo onnistuttiin rei'ittämään amfoterisiini-B:n avulla, siirryttiin tämän jälkeisissä mittauksissa standardiin kokosolu-patch-clampiin, sillä se on nopeampi ja mittausaltaassa oleva leike myös säilyy pidempään ja samaa leikettä voidaan käyttää useamman solun rekisteröintiin. Mikäli pipetillä liikutaan leikkeessä riittävän kauan, alkaa amfoterisiini-B:tä sisältävää liuosta diffundoitua leikkeeseen pipetin kärjestä. Ideaalitulanteessa gigaliitosta tehtäessä kärjessä olevaa normaalia intrasellulaariliuosta olisi vielä jäljellä ja amfoterisiini-B alkaisi tihkua vasta tässä vaiheessa kalvolle lopulta rei'ittäen sen. Perforaatio-patch-clamp-konfiguraatiossa on varminta vaihtaa leike uuteen, kun yhtä solua on rekisteröity riittävän kauan, sillä leike saattaa edellä kuvatusta syystä olla amfoterisiini-B:n kontaminoima. Kun rekisteröinti saatiin alkamaan perforaatio-patch-clamp-konfiguraatiossa, suljettiin aina välillä mikroskoopin valonlähde, jolloin ei siis nähty leikkeeseen. Tämä siksi, että amfoterisiini-B on valoherkkä aine, eikä sitä haluttu altistaa valolle enempää kuin oli pakko. Ainoassa amfoterisiini-B:llä suoritettussa mittauksessa, jossa päästiin kokosolu-tilanteeseen ja saatiin näin ollen aikaan varsinainen rekisteröinti, siirryttiin jo suoraan gigaliitoksen tekovaiheessa kokosolu-konfiguraation eli solu rei'ittyi erittäin helposti pelkän imun avulla. Tästä syystä ei pystytä arvioimaan, kauanko tässä koeasetelmassa amfoteriini-B:llä olisi kestänyt rei'ittää solukalvo. Amfoterisiini-B:n diffundoitumisnopeuteen vaikuttaa ainakin mittapipetin kärjen muoto, pipetin kärjessä käytetyn normaalin intrasellulaariliuoksen määrä sekä takapaineen suuruus. Mitä suurempi takapaine sitä kovemmalla nopeudella pipetin sisällä oleva liuos diffundoituu ulos kärjestä.

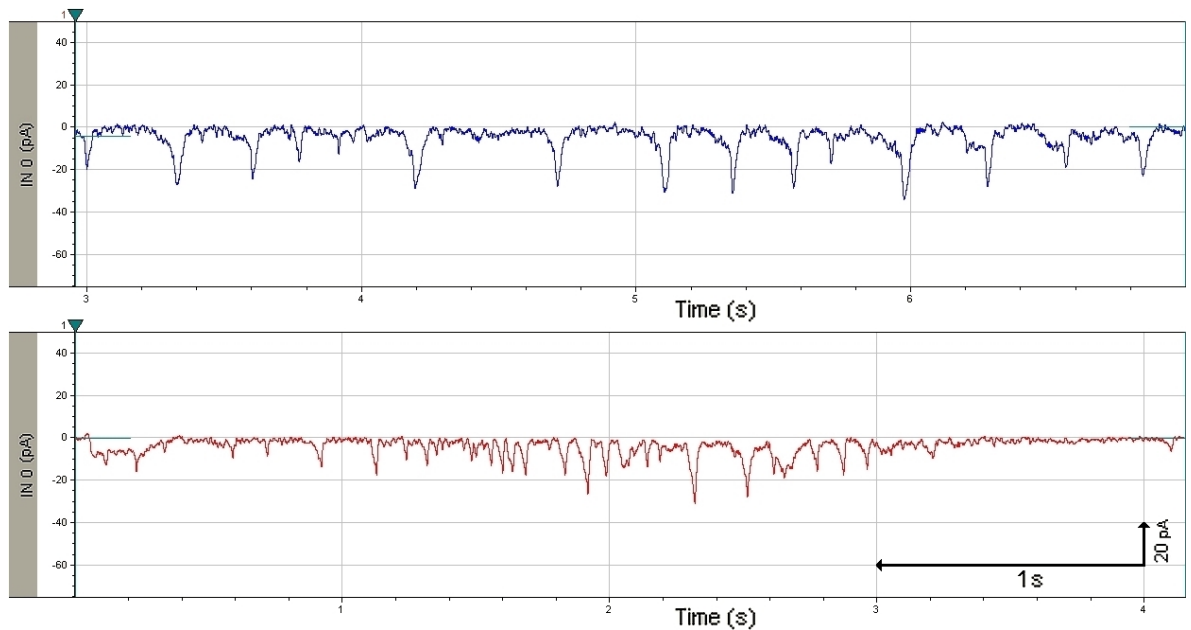
### 3.4 Tulokset

Kokeellisen osuuden mittauksia edeltäneiden esivalmistelujen aikana havaittiin selkeä ero eri mittapipettien välillä onnistuneen soluyhteyden luomisessa. Filamenttillisten, ulko- ja sisähalkaisijoiden väliseltä suhteeltaan 1,5:1,12 (OD/ID-suhde) borosilikaattipipettien käyttöön ottaminen aiemmin käytettyjen filamentittomien, OD/ID-suhteeltaan 1,5:0,86 pipettien tilalla mahdollisti soluyhteyden aikaansaamisen ja kokosolumittausten suorittamisen. Edes amfoterisiini-B:n käyttäminen ei auttanut soluyhteyden saamisessa OD/ID-suhteeltaan suuremmilla pipeteilla. Eroa gigaliitosten onnistumisessa ei kuitenkaan havaittu pipettien välillä.

Rekisteröitäessä eksitatorisia postsynaptisia virtoja (EPSC) streptotsotosiinilla indusoitua diabetestä sairastavilta Hannovers-urosrötilta ja terveiltä Han Wistar -kontrolliurosrötilta havaittiin sairaiden koe-eläinten spontaani aktiivisuus amplitudiltaan ja frekvenssiltään terveitä suuremmaksi. EPS-virtojen frekvenssi oli mittauksissa kaikilla amplitudeilla suurempi sairailta koe-eläimillä kuin terveillä verrokeilla, kuten kuvasta 3.19. voidaan havaita; 20 pA EPS-virtojen keskimääräinen frekvenssi oli sairaiden eläinten soluilla yli kuusinkertainen. Myös EPS-virtojen maksimaalinen amplitudi oli diabetestä sairastavilla koe-eläimillä terveitä suurempi. Suurin havaittu yksittäisen EPS-virran hetkellinen arvo oletettuun nolatasoon verrattuna diabetestä sairastavilla rotilla oli (-)143 pA. Kuvassa 3.20. esitetään päällekkäin yksittäisten diabeetikko- ja verrokkirotan solujen EPSC-kuvaaja ajan funktiona.



**Kuva 3.19.** Streptotsotosiinilla indusoitua diabetestä sairastavien (sin) ja terveiden verrokkiriottien (pun) EPSC-frekvenssi mitatun virran amplitudin funktiona. 20 pA EPSC frekvenssi oli sairailta koe-eläimillä yli kuusinkertainen.

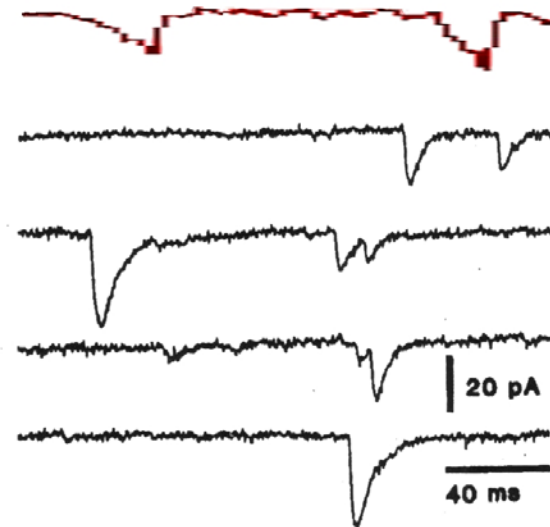


**Kuva 3.20.** Neljän sekunnin ote sairaan (sin) ja terveen kontrollikoe-eläimen (pun) yksittäisten solujen 140 Hz alipäästösuodatetusta EPSC-mittauksesta. EPSC-amplitudi on esitetty ajan funktiona. Kuvasta voidaan helposti havaita sairaan koe-eläimen solun yli 20 pA EPSC huomattavasti suurempi frekvenssi. Yksittäisen neliön korkeus on 20 pA ja leveys yksi sekunti.

### 3.5 Pohdinta ja johtopäätökset

#### 3.5.1. Mittaustuloksista

Diplomityön hypoteesina oli diabeettisesta neuropatiasta kärsivien rottien selkäytimen takajuuren substantia gelatinosan neuronien suurempi spontaani aktiivisuus verrattuna terveiden verrokkieläinten neuronien aktiivisuuteen. Koe-eläinten behavioraalisten testien perusteella on uskottu vastaavaa jo ennen solutason mittauksia, muun muassa Courteix ja kumppanien tutkimustulosten perusteella (Courteix ym. 1992). Substantia gelatinosan solujen ja primääriafferenttien kipuaistisolujen välisiä muutoksia diabeteksessä ei kuitenkaan ole aiemmin tutkittu solutason leike-patch-clamp-mittauksin. Mitattaessa terveiden rottien spontaania aktiivisuutta on aiemmissa töissä saatu diplomityön terveiden koe-eläinten mittaustulosten kanssa yhteneviä havaintoja. Muun muassa Yoshimuran ja Nishin mittauksissa postsynaptisten virtojen frekvenssi vaihteli välillä 1–20 Hz ja amplitudi välillä 1–50 pA (kuva 3.21) (Yoshimura & Nishi 1993). Diplomityön kokeellisen osuuden mittausten aikana kävi jo pian selväksi selkeä ero diabeettisten ja terveiden koe-eläinten SG-neuronien solun sähköfysiologisessa aktiiviteetissa. Mittaustulokset olivat siis täysin hypoteesin mukaisia.



**Kuva 3.21.** Terveiden kontrollirottien spontaaneja EPS-virtoja. Ylin mittaustuloksista on diplomityön koe-eläimen solusta mitattu, neljä alempaa Yoshimuran ja Nishin tutkimuksesta (Yoshimura & Nishi 1993)



### 3.5.2. Koelaitteiston ja leiketutkimusasetelman soveltuvuudesta diabeettisen neuropatian tutkimukseen

Diplomityön tutkimusongelman kannalta samalla koe-eläinmallilla suoritettavat behavioraaliset ja hermosyytason testit luovat pohjan sähköfysiologiselle mittaamiselle; diabeettisen neuropatian tunnusmerkit näkyvät käytöstasolla, mutta leike-patch-clamp-menetelmällä saadaan sähköisen aktiviteetin muutokset näkymään myös solutason selkäydinleikerekisteröinneissä.

Wan Ye-Hongin ja kumppaneiden tutkimuksessa vuodelta 2004 mitattiin IR-DIC -tekniikkaa hyödyntäen rottien selkäydinleikkeistä muun muassa spontaaneja eksitatorisia postsynaptisia virtoja, joita välittivät A- ja C- tyyppiset primäärit afferentit säikeet. Mittaukset suoritettiin -70 mV:n jännitelukituksessa. Tämän tutkimuksen asetelma oli hyvin samanlainen kuin omassa mittauksessamme sekä kontrollirottien että diabeettisten rottien selkäydinleikkeissä hyödynnetty (Ye-Hong ym. 2004).

Diabeettisen neuropatian tutkimuksessa tarvittiin diabetestä sairastavia koe-eläimiä. Diplomityössä käytetty menetelmä diabeteksen aikaansaamiseksi koe-eläimille ei olekaan uusi. Muun muassa Courteix ja Ahlgren kumppaneineen ovat käyttäneet streptotsotosiinia diabeteksen indusoimiseksi (Courteix ym. 1992, Ahlgren ym. 1992). Menetelmän etuna on päästä tutkimaan diabeteksen kokonaisvaltaisia vaikutuksia koe-eläimen fysiologiassa. Haittapuolena diabeteksen indusoiminen koe-eläimeen vaatii aikaa – jo verensokerin nouseminen diabeteksen tasolle vaatii noin viikon ajan – ja koe-eläin joutuu sairastamaan tautia sen kehittyessä, jo ennen varsinaista tutkimusta. Diplomityön suorittamisessa ei odottamisesta koitunut merkittäviä ongelmia, sillä mittalaitteiston pystyttäminen ja koeasetelman optimoiminen vaativat aikaa työn alkuvaiheessa.

Leike-patch-clamp-menetelmä tuo diabeettisen neuropatian vaikutusten spesifiseen tutkimukseen huomattavaa lisätarkkuutta verrattuna karkeisiin behavioralisiin ja sähköfysiologisiin testeihin. Menetelmällä saatiin tarkasteltua diabeettista neuropatiaa kudostasolla säilyttäen kipureitin ensimmäisten neuronien väliset yhteydet ja synapseja ympäröivän soluvälitilan luonteen. Leikkeiden sisemmissä kerroksissa neuronit säilyvät

hyvin ja kehonulkoisen ympäristön vaikutukset minimoituvat. Vaikutusta tuki näytteen pitäminen mittaustilanteessa mahdollisimman fysiologisissa olosuhteissa niin lämpötilan, pH:n kuin hapen kierron suhteen. Diplomityön koeasetelmaa vastaavia lämpötilan ja pH:n parametreja on aikaisemmin hyödynnetty menestyksekkäästi (Yoshimura & Nishi 1993, Santos ym. 2007, Kosugi ym. 2007).

Diplomityössä valmistetun koelaitteiston suurimpia etuja ovat mahdollisuus visualisoida näytteeseen eteneminen ja liitosalue sekä hienovaraiset liikkeet mahdollistava mikromanipulaattori. Visualisointi nopeuttaa merkittävästi terveen solun löytämistä ja oikeanlaisen pipetin ja solukalvon välisen kontaktin luomista. Ohjelmistopohjainen käyttöliittymä on looginen ja suhteellisen käyttäjäystävällinen. Tulevaisuudessa sen edut suhteessa manuaali-patch-clamp-laitteistoon edelleen korostuvat monimutkaisempia mittauskonfiguraatioita käytettäessä. Mittauksissa voidaan hyödyntää esimerkiksi ennalta ohjelmoituja, säännöllisesti toistuvia virransyöttöpulsseja. Pystytetty laitteisto sijaitsee tutkimuskeskuksen pohjakerroksessa ikkunattomassa tilassa kaukana ulkoisista mekaanisista tai sähköisistä häiriölähteistä. Laitteiston sijoittaminen alimpaan kerrokseen vähentää muun muassa värinähäiriöitä. Tärkeä merkitys tässä suhteessa on myös värinäestopöydällä, jollaista aiemmin käyttämissäni sähköfysiologisissa laitteistoissa ei ole ollut. Leikkeiden valmistamisessa käytetty mikrotomi ja disekointivälineet toimivat erinomaisesti. Jokaisessa valmistetussa leikkeessä voitiin IR-DIC-menetelmällä löytää mittaukseen soveltuvia hyväkuntoisia soluja sopivalla syvyydellä leikkeessä. Leikkeideteon luotettava onnistuminen on ehdoton edellytys leike-patch-clamp-mittaustoiminnalle.

Pilottikokeissa onnistuttiin luomaan kokonaisuudessaan toimiva koeasetelma. Leikkeiden ylläpitoliuosten toimivuuden osoitti solujen säilyminen hyväkuntoisina silminnähden sekä toiminnallisesti pitkänkin mittauspäivän iltaan saakka. Pipettien dimensiot ja materiaali saatiin lopulta optimoitua tasolle, joka mahdollisti gigaliitoksesta kokosolukonfiguraatioon pääsemisen noin joka kolmannella yrittämällä. Menestyksekkäästi käytettyjen pipettien dimensiot ja kärjen vastukset ovat kuitenkin vaihdelleet aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa, vaikka kokosolu-patch-clamp-mittauksissa suositeltu OD/ID-suhde on noin

1,2–1,4 (Walz ym. 2002). Pipetit ovat saattaneet olla paksu- tai ohutseinäisiä, filamentillisia tai filamentittomia. Toimineet paksuseinäiset pipetit oli tutkimuksissa käsitelty kiillotuslaitteella. (Kosugi ym. 2007, Santos ym. 2007, Yoshimura & Nishi 1993). Monissa artikkeleissa pipettien ominaisuuksien esittely on kuitenkin vähäistä jopa puutteellista. Diplomityön koe-osuudessa varsinaisen gigaliitoksen aikaansaaminen ei kuitenkaan osoittautunut kynnyksysymykseksi, vaan liitoksen aikaansaaminen onnistui pipettityypistä riippumatta hyvällä todennäköisyydellä. Tosin gigaliitoksia saatiin hieman enemmän 1,5:1,12 OD/ID-suhteen omaavilla filamentillisilla pipeteillä. Laboratorioon tilattiinkin kiillotuslaite pipettien liitoksenteke-ominaisuuksien parantamiseksi entisestään.

Koelaitteistoa voi toki parantaa. Esimerkiksi vielä parempaan visualisointiin saatetaan päästä hyödyntämällä LED-pohjaista valaistustekniikkaa (Pinto ym. 2008). Mikäli jokin koeasetelma pystytetyllä laitteistolla vaatii tulevaisuudessa laajamittaisempaa perforaatio-parch-menetelmän käyttöä, tulisi hyödyntää indikaattoriväriainetta, joka varoittaisi perforoidun solukalvoalueen laajamittaisesta rikkoutumisesta ja pipetin sisäisen ja solunsisäisen nesteen sekoittumisesta (Santos ym. 2007).

Leike-patch-clamp-tekniikka soveltuu hyvin diabeettisten ja verrokkien spontaanin aktiivisuuden tutkimukseen.

### 3.5.3. TRPA1-kanavien rooli; aiempi tutkimus ja tulevaisuus

Kosugi ja kumppanit esittivät artikkelissaan vuonna 2007 (Kosugi ym. 2007) substantia gelatinosan neuronien kokosolumittauksissa saamiensa tulosten perusteella neuronien eksitatoristen postsynaptisten virtojen amplitudin ja virtapiikkien frekvenssin kasvavan tilastollisesti merkittävästi, kun tutkimusnäyteleikkeen solut altistettiin 100  $\mu\text{M}$  allyyli-isotiosyanaatille (AITC). AITC on selektiivinen TRP-kanavien agonisti. Tutkimuksessa havaitut sähköisen toiminnan muutokset AITC:tä käytettäessä – EPS-virtojen esiintymisfrekvenssin ja amplitudin kasvu – vastaavat hyvin diplomityön mittauksissa diabeettisilla koe-eläimillä havaittuja. Vaikutukset hävisivät käytettäessä 300  $\mu\text{M}$  ruthenium red -liuosta (RR). RR on tutkimukseen hyvin soveltuva TRP-kanava-antagonisti. Uusia agonisti- ja antagonistitestejä suorittamalla voidaan todennäköisesti erotella TRP-

kanavien vaikutukset muista spontaaniaktiivisuuden eroja selittävistä ilmiöistä entistä tarkemmin. Mikäli TRPA1-kanava varmistuu yhtä potentiaalisesti selektiiviseksi vaikutuskohdaksi diabeteksen aiheuttamien kipuhermosyiden aktiivisuuden kasvun kumoamisessa, on TRPA1-kanava erittäin houkutteleva kandidaatti lääkekehityksen kohdeproteiiniksi.

Tulevaisuudessa tulee myös kartoittaa tarkemmin TRP-kanavien sijainti primääriafferenttien kipuhermosyiden ja SG:n neuronien synapsialueella. Tällä hetkellä TRP-kanavien on esitetty sijaitsevan presynaptisesti primääriafferentin hermosolun sentraalisessa päässä, niin synapseissa SG-neuronien kuin alueen inhibitoristen interneuronien kanssa (Kosugi ym. 2007). Kanavien mahdollisesta esiintymisestä kipuradan sekundääriafferenteissa (SG:n) neuroneissa ei kuitenkaan ole tarkasti tutkittu.

#### 4. Yhteenveto

Aiemman diplomityön aiheeseen liittyvän tutkimuksen perusteella voidaan olettaa, että diabeettisesta neuropatiasta kärsivien rottien selkäytimen takajuuren substantia gelatinosassa neuronien spontaani aktiivisuus on suurempaa kuin terveiden kontrollikoe-eläinten vastaavan alueen neuronien aktiivisuus. Kirjallisuuskatsausosiossa esitetään tätä hypoteesia tukevia aikaisempia tutkimustuloksia kipuaistimuksen välittymiseen osallistuvien TRPA1-kanavien roolista neuropaattisessa kivussa sekä taustoitetaan muutoinkin tutkimusaihetta ja -asetelmaa. Kirjallisuuskatsausosiossa esitellään myös tutkimuslaitteiston pystyttämisen sekä mittausten suorittamisessa hyödynnettäviä esivalmisteluja, pystytettävältä laitteistolta vaadittavia ominaisuuksia ja sovellettuja patch-clamp-mittausmenetelmiä yleisten periaatteiden tasolla.

Diplomityön kokeellisessa osassa kuvataan pystytetty leike-patch-clamp-laitteisto ja esitetään seikkaperäisesti laitteiston pystyttämisen ja mittausten suorittamisen vaaditut esivalmistelut ja mittausprotokollat diplomityön koearon tapauksessa. Koearon haastavimmaksi ja lopulta peräti ratkaisevaksi osoittautunut esivalmistelukysymys oli pipettien dimensioiden saattaminen optimaaliseksi solun rei'ittämisen kannalta. Yllättävää työssä olikin, ettei kynnyksymykseksi osoittautunut gigaliitoksen aikaansaaminen vaan haastavaa oli nimenomaan solun rei'ittäminen gigaliitoksen muodostuttua. Tämäkin ongelmakohta onnistuttiin ratkaisemaan ja lopulta päästiin tämän ja muiden koelaitteiston esivalmistelujen ja optimoinnin kautta varsin hyvään onnistumisprosenttiin kokosoluyhteyden muodostamisessa ja sitä kautta leiketason kokosolu-patch-clamp-mittausten suorittamisessa. Kokeellisessa osassa myös esitetään mittausten päätulos eli diabeettisesta neuropatiasta kärsivien rottien selkäytimen takajuuren substantia gelatinosan neuronien selvästi suurempi spontaani aktiivisuus verrattuna terveiden verrokkieläinten neuronien aktiivisuuteen. Tulos oli siis täysin hypoteesin mukainen. Jatkotutkimustarpeita arvioitaessa keskeiseksi nousee TRPA1-kanavien roolin ja toimintaperiaatteiden tarkempi kartoitus. Tämän jälkeen, mikäli tarkentavat mittaukset ovat tähänastisten taustoittavien mittausten mukaisia eli saadaan erotettua TRPA1-kanavien rooli muista

spontaaniaktiivisuutta kasvattavista tekijöistä ja edelleen vahvistettua sen määräävä rooli tässä tarkoituksessa, siirrytään lääkeainekandidaatin vaikutusten testaamiseen.

Laitteisto tulee mitä todennäköisimmin lunastamaan paikkansa informaatioarvoltaan korkeaa tietoa tarjoavana keskeisenä osana tulevaisuuden lääkekehitystä tukevissa sovelluksissa, joissa halutaan todentaa leiketason hermostollisia vasteita. Tällainen tieto on keskeinen lisä muille solu- ja molekyyli-tason tutkimuksille ympäröivän kudoksen suhteellisen intaktin säilymisen vuoksi.

Diabeettisen neuropatian lääkehoidon kehittämisen tarve on kiistatta keskeinen ja diplomityön valossa näiden oireiden lääkehoidon kehittämisen mahdollisuus näyttää työn lähtökohdista hyvin lupaavalta. Keskushermostovaikutusten leiketason tutkimukselle on kuitenkin jo tällä hetkellä laajempikin tarve. Esimerkiksi Alzheimerin taudin lääkehoidon edelleen kehittämisessä riittää haasteita, joissa pystytettyä laitteistoa voidaan hyödyntää kunhan koeasetelman mukaiset esivalmistelut kuten pipettien parametrit ja liuosten koostumus on optimoitu tämän tutkimusongelman kannalta sopiviksi. Sähköfysiologisilta (erityisesti suhteellisen matala signaalin häiriötaso) ja mekaanisilta ominaisuuksiltaan (erityisesti hienovaraisen työskentelyn mahdollistava mikromanipulaattori) sekä leikkeiden valmistamisen ja säilyttämisen periaatteiden osalta (erinomainen leikkeidenteon onnistumisprosentti ja säilyvyys hyväkuntoisena läpi mittauspäivän) ja tehokkaan visualisointimenetelmänsä ansiosta laitteisto itsessään lienee sovellettavissa hyvinkin monipuolisesti hermostotason sähköfysiologisten toimintojen tutkimukseen.

## 5. Lähteet

1. Abbadie C., Taylor B.K., Peterson M.A., Basbaum A.I. Differential contribution of two phases of formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanyl and lidocaine. *Pain*, 1997; 69: 101-10.
2. Abbott F.V., Franklin K.B. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 1995; 60: 91-102.
3. Aghajanian G.K., Rasmussen K. Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. *Synapse*, 1989; 3: 331-8.
4. Ahlgren S.C., White D.M., Levine J.D. Increased Responsiveness of Sensory Neurons in the Saphenous Nerve of the Streptozotocin-Diabetic Rat. *Journal of neurophysiology*, 1992; 68.
5. Apfel S.C. Nerve degeneration in diabetic neuropathy. *Diabetes Obes metab*, 1999; 1: 3-11.
6. Arreola-Espino R., Urquiza-Marín H., Ambriz-Tututi M., Araiza-Saldaña C.I., Caram-Salas N.L., Rocha-González H.I., Mixcoatl-Zecuatl T., Granados-Soto V. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 2007; 577: 203-10.
7. Ashley R.H. *Ion Channels: A Practical Approach*. Oxford University Press, 1995.
8. Attal N., Bouhassira D. Mechanisms of pain in peripheral neuropathy. *Acta Neurol Scand Suppl*, 1999; 173: 12.
9. Baba H., Kohno T., Okamoto M., Goldstein P.A., Shimoji K., Yoshimura M. Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *Journal of Physiology*, 1998; 508.1: 83-93.
10. Backonja M. Managing painful diabetic neuropathy. *Hosp Pract*, 1999; 34: 79.
11. Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., Viswanath V., Eid S.R., Petrus M.J., Earley T.J., Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 2004; 41: 849-57.
12. Basbaum A.I., Jessell T.M. *Principles of neuroscience*. mCgRAW-Hill, New York, 2000.
13. Bean B.P. Whole-cell recording of calcium-channel currents. *Methods Enzymol*, 1992; 207: 181-93.
14. Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.A. *Neuroscience Exploring the Brain*. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
15. Berne R.M., Levy M.N., Koeppen B.M., Stanton B.A. *Physiology*. Elsevier, Inc, 2004.
16. Berridge M.J., Lipp M.D., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 1: 11-21.
17. Cameron N.E., Eaton S.E., Tesfaye H.E. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 2001; 44: 1973.
18. Cesare P., McNaughton P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996; 93: 15435-9.

19. Clapham D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 2003; 426: 517-24.
20. Coderre T.J., Vaccarino A.L., Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*, 1990; 535: 155-8.
21. Corey D.P., Garcia-Añoveros J., Holt J.R., Kwan K.Y., Lin S-Y., Vollrath M.A., Amalfitano A., Cheung E.L.-M., Derfler B.H., Duggan A., Gwénaëlle S.G., Gray P.A., Hoffman M.P., Rehm H.L., Tamasauskas D., Zhang, D-S. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*, 2004; 432: 723-30.
22. Cosens D.J., Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 1969; 224: 285-7.
23. Courteix C., Eschalier A., Lavarenne, J. Streptozotocin-induced diabetic rats. Behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*, 1993; 53: 81-8.
24. Diabetesliitto, kotisivut, <http://www.diabetes.fi/diabtiet/hoitsuos/neuropat/yleista.htm#a23>. Tulostettu 16.10.2008.
25. Djouhri L., Bleazard L., Lawson S.N. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol*, 1998; 513: 857-72.
26. Faber E.S., Chambers J.P., Evans R.H. Depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission by four alpha2 adrenoceptor agonists on the in vitro rat spinal cord preparation. *Br J Pharmacol*, 1998; 124: 507-12.
27. Finkel A., Bookman R. The electrophysiology setup. *Curr Protoc Neurosci*, abstr, 2001; 6.
28. Galer B.S., Gianas A., Jensen A.P. Painful diabetich polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes. Res Clin Pract*, 2000; 47: 123-8.
29. Guler A.D., Lee H., Iida T., Shimizu I., Tominaga M., Caterina M. Heatevoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci*, 2002; 22: 6408–14.
30. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakman B., Sigworth F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 1981; 391: 85-100.
31. Hardie R.C., Minke B. The *trp*-gene is essential for a light-activated  $Ca^{2+}$ -channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 1992; 8: 643-51.
32. Harvard Bioscience, kotisivut, <http://www.harvardbioscience.com>. Tulostettu 22.10.2008.
33. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc, 2001.
34. Hinman A., Chuang H.H., Bautista D.M., Julius, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 19564-8.
35. Horn R., Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J.Gen. Physiol*, 1988; 92: 145-59.
36. Ishii H., Kohno T., Yamakura T., Ikoma M., Baba H. Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 2008; 27: 3182-90.



37. Jackson M.B. Whole-Cell Voltage Clamp Recording. *Current Protocols in Neuroscience*, 1997; 6: 1-30.
38. Jiang N., Furue H., Katafuchi T., Yoshimura M. Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn in vitro. *Neuroscience Research*, 2003, 47: 97-107.
39. Johnston D., Miao-Sin Wu S. *Foundations of Cellular Neurophysiology*. Massachusetts Institute of Technology, 1995.
40. Jordt S.E., Bautista D.M., Chuang H.H., McKemy D.D., Zygmunt P.M., Hogestatt E.D., Meng I.D., Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 2004; 427: 260-5.
41. Julius D., Basbaum A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 2001; 413: 13.
42. Kaila Kai. *Hermoston ja käyttäytymisen biologiaa*. Otava, 1985.
43. Klepac N., Rudes Z., Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomed Pharmacother*, 2006; 60: 32-5.
44. Kobayashi Y. Distribution and morphology of spinothalamic tract neurons in the rat. *Anat Embryol*, 1998; 197: 51-67.
45. Konttinen Y.T., Kemppinen P., Hukkanen M., Sorsa T., Santavirta S. Nosiseptiosta kipuun: tuntuako vai ei? *Duodecim*, 1994; 110: 545.
46. Korn S.J., Marty A., Connor J.A., Horn R. Perforated Patch Recording. *Methods in Neuroscience*, 1991; 4.
47. Kosugi M., Nakatsuka T., Fujita T., Kuroda Y., Kumamoto E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *The journal of Neuroscience*, 2007; 27: 4443-51.
48. Levine J.D., Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007; 1772: 989-1003.
49. Macpherson L., Geierstanger B.H., Viswanath V., Bandell M., Eid S.R., Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol*, 2005; 15: 929-34.
50. Macpherson L.J., Dubin A.E., Evans M.J., Marr F., Schultz P.G., Cravatt B.F., Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 channel through covalent modifications of cysteines. *Nature*, 2007; 445: 541-5.
51. Malmberg A.B., Yaksh T.L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; 263: 136-46.
52. McKemy D.D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol. Pain*, 2005; 1: 16.
53. McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 2002; 416: 52-8.

54. McNamara C., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *National Academy of Sciences of the USA*, 2007; 104: 13525-30.
55. Molecular Devices, kotisivut, <http://www.moleculardevices.com>. Tulostettu 22.10.2008.
56. Molleman A. Ten Steps to Better Patch Clamping; An expert on the technique shares his secrets, <http://www.the-scientist.com/article/print/24911>. Tulostettu 17.7.2008
57. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005; 22: 272.
58. Montell C., Rubin G.M. Molecular characterization of the drosophila trp locus: a pupative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 1989; 2: 1313-23.
59. Moqrich A., Hwang S.W., Earley T.J., Petrus M.J., Murray A.N., Spencer K.S., Andahazy M., Story G.M., Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 2005; 307: 1468–72.
60. Nagata K., Duggan A., Kumar G., Garcia-Anoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J.Neurosci*, 2005; 25: 4052-61.
61. Namer B., Handwerkwe H.H., Maihöfner C. TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol. *NeuroReport*, 2005; 16: 955-9.
62. Neher E., Sakmann B. *Nature*, 1976; 260: 799.
63. Nienstedt W., Hänninen O., Arstila A., Björkqvist S.-E. Ihmisen fysiologia ja anatomia. WSOY:n graafiset laitokset, Porvoo, 1992.
64. Nishida S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine*, 2005; 27: 101-46.
65. Obata K., Katsura A.H., Mizushima T., Yamanaka H., Kobayashi K., Dai Y., Fukuoka T., Tokunaga A., Tominaga M., Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*, 2005; 115: 2393-401.
66. Ogden D.C. Microelectrode techniques, The Plymouth workshop handbook. Company of Biologists, Cambridge, UK, 1994.
67. Oh U., Hwang S.W., Kim D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 1996; 16: 1659-67.
68. Patapoutian A., Peier A.M., Story G.M., Viswanath V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature reviews neuroscience*, 2003; 4: 529-39.
69. Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius, B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium*, 2005; 38: 233-52.
70. Peier A.M., Reeve A.J., Andersson D.A., Moqrich A., Earley T.J., Hergarden A.C., Story G.M., Colley S., Hogenesch J.B., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, 2002; 296: 2046-9.
71. Pertovaara A., Wei H. Peripheral effects of morphine in neuropathic rats: role of sympathetic postganglionic nerve fibers. *Eur J Pharmacol*, 2001; 19: 139-45.

72. Petersen C.C., Berridge M.J., Borgese M.F., Bennett D.L. Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J*, 1995; 311: 41-4.
73. Pinto V., Szűcs P., Derkach V.A., Safranov B.V. Monosynaptic convergence of C- and A $\delta$ -afferent fibers from different segmental dorsal roots on to single substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *Physiology in Press*, published online on July 31, 2008 as 10.1113/jphysiol.2008154898.
74. Polydefkis M., Griffin J.W. and McArthur J. New insights into diabetic polyneuropathy. *JAMA*, 2003; 290:1371-6.
75. Pusch M., Neher E. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Arch*, 1988; 411: 204-11.
76. Rae J.L., Fernandez J. Perforated Patch Recordings in Physiology. *Int Union Physiol Sci*, 1991; 6.
77. Rae J.L., Levis R.A. Glass technology for patch clamp electrodes. *Methods in enzymology*, 1992; 207: 66-91.
78. Raja S.N., Meyer R.A., Ringkamp M., Campbell J.N. Textbook of pain, Churchill, Livingstone, Edinburgh, 1999.
79. Reichling D.B., Levine J.D. Heat transduction in rat sensory neurons by calcium-dependent activation of a cation channel. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 1997; 94: 7006–11.
80. Roudet C., Mouchet P., Feurstein C., Savasta M. Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci Res*, 1994; 39: 319-29.
81. Santos S.F.A., Rebelo S., Derkach V.A., Safranov B.V. Excitatory interneurons dominate sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat. *J Physiol*, 2007; 581.1: 241-54.
82. Schmidt R., Schmelz M., Forster C., Ringkamp M., Torebjörk E., Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*, 1995; 15: 333-41.
83. Scott-Ward T.S., Chen J.-H., Li H., Cai Z., Sheppard D.N. Investigating the CFTR Cl<sup>-</sup> channel using the patch-clamp technique: an overview. Provide through The European working group on CFTR expression, 2003, [http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/d/sheppard\\_investigating\\_cftr\\_channel\\_patch\\_clamp\\_overview.pdf](http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/d/sheppard_investigating_cftr_channel_patch_clamp_overview.pdf) . Tulostettu 17.7.2008.
84. Serra J. Overview of neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand Suppl*, 1999; 173: 7.
85. Sheetz M.J., King G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*, 2002; 288: 2579.
86. Sherman-Gold R. The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques. Axon Instruments, Inc, 1993.
87. Sima A. A. F., Thomas P.K., Vinik A. Diabetic neuropathies. *Diabetologia*, 1997; 40: 74-77.
88. Sindrup S.H., Jensen T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain*, 1999; 83: 389-400.

89. Sonohata M., Furue H., Katafuchi T., Yasaka T., Doi A., Kumamoto E., Yoshimura M. Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol*, 2003; 555.2: 515-26.
90. Stone L.S., Broberger C., Vulchanova L., Wilcox G.L., Hokfelt T., Riedl M.S., Elde R. Differential distribution of alpha2A and alpha2C adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci*, 1998; 18: 5928-37.
91. Story G.M., Peier A.M., Reeve A.J., Eid S.R., Mosbacher J., Hricik T.R., Earley T.J., Hergarden A.C., Andersson D.A., Hwang, S.W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold-temperatures. *Cell*, 2003; 112: 819-29.
92. Sutter Instruments, kotisivut, <http://www.sutter.com>. Tulostettu 21.10.2008
93. Tamae A., Nakatsuka T., Koga K, Kato G., Furue H., Katafuchi T., Yoshimura M. Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J Physiol*, 2005; 568: 243-53.
94. Tjolsen A., Berge O.D., Hunskaar S., Rosland J.H., Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 1992; 51: 5-17.
95. Tortora G. J., Grabowski S. R. Introduction to the human body. Wiley, 2003.
96. Vincent A. M., Russell J. W., Low P., Feldman E. L. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 2004; 25: 612-28.
97. Vinik A. Clinical review: use of antiepileptic drugs in the treatment of chronic painful diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90: 4936.
98. Voets T., Talavera K., Owsianik G., Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nature chemical biology*, 2005; 1: 85-92.
99. Voipio Juha, 2004. Johdatus sähköfysiologisen mittatekniikan perusteisiin. Opetusmoniste.
100. Walz W., Boulton A.A., Baker G. B. *Neuromethods 35, Patch-Clamp Analysis Advanced Techniques*. Humana Press Inc, 2002.
101. Watanabe H., Vriens J., Suh S.H., Benham C.D., Droogmans G., Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem*, 2002; 277: 47044–51.
102. Wood J.N., Winter J., James I.F., Rang H.P., Yeats J., Bevan S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci*, 1988; 8: 3208–20.
103. Woolf C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 1983; 15-21: 686-8.
104. World Precision Instruments, kotisivut, <http://www.wpiinc.com/v6/glass-holders>. Tulostettu 22.10.2008.
105. Ye-Hong W., Yu-Yinng W., Fei D., San-Jue H. Visually guided patch-clamp recording of spinal dorsal horn neuron's postsynaptic current evoked by primary afferent fiber. *Acta Physiologica Sinica*, 2004; 56: 550-7.

106. Yoshimura M., Jessell T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *Journal of Physiology*, 1990; 430: 315-35.
107. Yoshimura M., Nishi S. Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents. *Neuroscience*, 1993; 53: 519-26.
108. Yoshimura M., Nishi S. Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord *in vitro*. *Journal of Physiology*, 1995; 482: 29-38.
109. Ziegler D. Painful diabetich neuropathy: treatment and future aspects. *Diabetes Metab Res Rev*, 2008; 24: 2-7.